Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Untersuchungen über die Knopfbildung bei Salmonellakolonien unter besonderer Berücksichtigung der Unterscheidung zwischen Paratyphus B- und Enteritiserregern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Reinhard Stunkat, Medizinalassistent,
aus Berlin

1961

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KNOPFBILDUNG BEI SALMONELLAKOLONIEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER UNTERSCHEIDUNG ZWISCHEN PARATYPHUS B- UND ENTERITISERREGERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Reinhard Stunkat, Medizinalassistent,
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Helmut S e l b a c h

Referent: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t

Korreferent: Professor Dr. med. Georg H e n n e b e r g

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22. September 1961

I N A L T S Ü B E R S I C H T

A Einleitung Seite 1

B Problemstellung und eigene Untersuchungen 7

I. Material und Methoden

1. Bakterienstämme 7

2. Nährböden 7

a) ENDO-Agar und andere Nährmedien

b) Änderung des pH-Wertes der Nährböden 9

c) Änderung der Feuchte und der Agarkonzentration 10

d) Unterschiedliche Nährbodenhöhe 11

3. Impftechnik 11

4. Bebrütungstemperatur und -dauer 12

5. Mediosagittalschnitte 12

6. Photographien 15

II. Ergebnisse 17

1. Beeinflussung der Knopfbildung durch:

a) ENDO-Agar und andere Nährböden 17

b) pH der Nährböden 23

c) Bebrütungstemperatur 24

d) unterschiedliche Feuchte 27

e) verschiedene Agarkonzentration 28

f) Nährbodenhöhe und Dichte des Koloniewachstums 29

2. Weiterimpfung knopfloser Kolonien von Enteritis-Salmonellakeimen 32

3. Mischkultur 33

4. Prüfung der Knopfbildung einer größeren Zahl von Salmonellastämmen auf ENDO-Agar Seite 35
5. Sagittalschnitte und Photographien 41
III. Diskussion 45
1. Ursache der Knopfbildung
2. Bedeutung der Knopfbildung 47
C Zusammenfassung 51
Schrifttum 53

A EINLEITUNG

Bei der Durchsicht der Literatur älteren Datums über Paratyphus- und Enteritiserkrankungen fällt auf, daß die heute übliche strenge Trennung zwischen den eigentlichen Paratyphuserregern (S. paratyphi A, B und C) einerseits und den Enteritiserregern (übrige Salmonellen außer S. typhi) andererseits nicht vorgenommen worden ist. Vielmehr wurden Paratyphus und Gastroenteritis als zwei Erscheinungsformen einer ätiologisch einheitlichen Infektionskrankheit angesehen (11, 59).

Die eindeutige Unterscheidung zwischen Paratyphus B- und Enteritis-Breslau-Bakterien (S. typhi murium) gelang

1. mit Hilfe des 1905 von FISCHER (16) empfohlenen Mäusefütterungsversuches,
2. durch Feststellung verschiedener Wuchsformen auf Agar und
3. mit biochemischen Methoden (43).

Die Schleimwallbildung, zum erstenmal 1903 von CONRADI, v. DRIGALSKI und JÜRGENS (8) beobachtet, wurde als kennzeichnend für Paratyphus B-Bakterien von v. DRIGALSKI (10) und B. FISCHER (15) angegeben.

Als charakteristisch für Enteritis-Breslau-Bakterien galt die 1925/1926 von ELKELES (12), GRAETZ (17), MIESSNER (40) und KNORR (32) beschriebene Radspeichen-, Gullydeckel-, Rosetten- oder Korallenstruktur, von BRINCK (6) auch als Felderung bzw. Riffelung und Fältelung und schon 1914 von R. MÜLLER (45) als "eigenartig trocken, runzlig" bezeichnet,

ferner die Verwurzelung und die Bildung fester Membranen (ELKELES (12)).

Ein weiterer Kulturunterschied war die Raffinosereaktion (R. MÜLLER (41, 42)). In Kolonien von Paratyphus B-Bakterien auf Nähragar mit 1 - 2 % Raffinose (45, 43) bildeten sich nach 4 - 14 Tagen Bebrütung bei 37° C "zahlreiche kleine Knötchen" oder "Knöpfe", in Enteritisbakterienkolonien dagegen im allgemeinen nicht. Wegen der langen Dauer bis zum Auftreten dieser Knöpfe waren der diagnostischen Anwendung Grenzen gezogen (13).

Die Typendiagnose der Salmonellen erfolgt heute serologisch, kulturell-biochemisch und zur weiteren Unterteilung mit Hilfe von Bakteriophagen (5, 30).

SCHMIDT und LENK (54) berichteten 1957 über eine bei einer Enteritisepidemie isolierte Mischkultur von S. paratyphi B und S. java, die als serologisch gleiche, aber kulturell verschiedene Salmonellastämme auftreten. Auf das Vorliegen einer Mischkultur waren sie hingewiesen worden durch unterschiedliche Kolonieformen auf ENDO-Agar nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C. "Die Kolonie "a" entsprach dem uns bekannten Bild von Paratyphus B-Kolonien, sie war flacher und größer als die Kolonien " b" und zeigte keine Knopfbildung; die Kolonien "b" waren im Durchmesser kleiner, aber höher und in der Mitte der Kolonie mit einem Knopf versehen, so daß wir einen Enteritiserreger vermuteten."

Da die Knopfbildung auch bei anderen Enteritiserregern z. B. bei Abwasseruntersuchungen häufig beobachtet wurde (36), soll hier untersucht werden, ob diese Knopfbildung bei Enteritissalmonellen regelmäßig auftritt bzw. unter

welchen Bedingungen sie festzustellen ist. Denn der Gedanke liegt nahe, daß es sich hierbei vielleicht um ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal zwischen den Erregern der akuten Gastroenteritis und denen des Paratyphus B handelt.

Über knopfartige Erhebungen auf Bakterienkolonien finden sich zahlreiche Literaturangaben. Schon im Jahre 1904 beschrieb PREISZ (50) "feine Knötchen" oder "sekundäre Kolonieen", die nach zwei bis drei Tagen auf Agarkulturen von Milzbrandbazillen entstanden waren und sich aus Sporen entwickelt hatten. Auch bei anderen, nicht sporogenen Bakterien hatte er Sekundärkolonien gesehen und sich davon überzeugt, daß sie von der ursprünglichen Keimart gebildet werden.

MASSINI (39) untersuchte unter der Leitung von NEISSER (47) im Jahre 1907 ein Bacterium coli mutabile, das auf dem ENDO-Nährboden in farblosen Kolonien wuchs, in denen vom dritten Tage an gelblichweiße, mit dem Alter dunkelrot werdende Knötchen entstanden. Die anfangs geringe Zahl von Knötchen in einer Kolonie wurde täglich größer. Abimpfungen von diesen Knötchen führten zu rot wachsenden Kolonien ohne Knötchen. Das Auftreten Laktose zersetzender Bakterien in einer diesen Zucker nicht angreifenden Bakterienkolonie wurde als die Ursache der Knötchenbildung angesehen und als Mutation bezeichnet. - BURK (7), der ein Jahr später die gleiche Beobachtung wie MASSINI ebenfalls an einem B. coli mutabile machte, sprach zum erstenmal von Knopfbildung.

R. MÜLLER (41, 42) stellte im selben Jahr fest, daß Typhusbakterien auf Nähragar mit 1 % Rhamnose (Isodulcit) Knöpfe

bildeten. "In jeder genügend allein stehenden Kolonie haben sich etwa vom 3. Tage ab einige Pünktchen entwickelt, die, bald an Zahl und Umfang zunehmend, sich als knopfartige Gebilde, als Tochterkolonieen über die Mutterkolonie herauswölben" (44). Die "Rhamnoseknopfbildung", die auch noch bei FLEXNER-Ruhrbakterien vorkommt (46), nannte er "das sicherste Kulturmerkmal der Typhusbakterien" (44).

Paratyphus B-Bakterien zeigen im Gegensatz zu Enteritisbakterien eine derartige Knopfbildung auf 2%igem Raffinose-Nähragar (R. MÜLLER (41, 42, 43)) und auf Sorbose-ENDO-Agar (RIETHMÜLLER-FAHRBACH (51)).
POHLE (49) beschrieb 1957 einen Dyspepsiecoli-Keim, der Laktose unregelmäßig verzögert vergärte, und zwei Salmonellen, die sich Xylose gegenüber entsprechend verhielten. Auf dem ENDO-Agar bzw. auf der Xylosefuchsinplatte traten nach mehrtägiger Bebrütung dunkelrote Tochterkolonien auf den ungefärbten Mutterkolonien auf. Durch Mutation mußte in den primär nichtvergärenden Bakterienstämmen eine vergärende Variante entstanden sein (49). So konnte auch die unregelmäßige Verzögerung der Vergärung gedeutet werden.

Alle bisher genannten Autoren waren von der Reinheit ihrer Kulturen überzeugt. HACKENTHAL und BIERKOWSKI (18) jedoch hielten die Knöpfchenbildung für ein sicheres Mischinfektsymptom. Sie hatten mehrere Staphylokokken-, Streptokokken-, Corynebakterien- und Milzbrandbazillenstämme und einen Pneumokokkenstamm, die alle ein zentrales Knöpfchen auf der Blutplatte aufwiesen, untersucht und sie jedesmal in mindestens zwei Stämme aufteilen können, die keine oder in einigen Fällen nur noch angedeutet Knöpfe bildeten.

Dem zentralen Einzelknopf einer Bakterienkolonie auf der Blutplatte entsprachen zahlreiche, unregelmäßig angeordnete Knöpfchen einer auf selenhaltiger Platte gewachsenen Kolonie. - Auch die Entstehung von Knöpfchen bei der Züchtung von Paradiphtheriebakterien auf der Tellurplatte führten sie auf die Existenz verschiedener Paradiphtheriestämme in einem Verbande zurück (3).

Die Knopfbildung der Salmonellen auf dem ENDO-Agar, die in dieser Arbeit untersucht wird, zeigt im Unterschied zu den meisten eben genannten Knöpfchen folgende Besonderheiten:

1. Jede knopftragende Kolonie besitzt nur einen zentral gelegenen Knopf.
2. Dieser Knopf entwickelt sich schon nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° C.
3. In der Farbe unterscheidet er sich nicht wesentlich von dem übrigen Teil der Kolonie, nur hat er infolge der größeren Bakterienmenge einen dunkleren Farbton.

WILSON und MILES (61) unterscheiden im Jahre 1955 zwischen "papillate surface" (höckeriger Oberfläche) einer Kolonie und "umbonate elevation" (schildblattförmiger = knopfartiger Erhebung) (Abb. 1). Diese Form der Erhebung entspricht der hier und im folgenden besprochenen Knopf-

Abb. 1

Kolonieformen

Handzeichnung nach Wilson und Miles (61)

Umbonate.

Convex with papillate surface.

form bei Salmonellen. Dementsprechend sollten Knöpfe abgegrenzt werden von Pünktchen, Knötchen, Knöpfchen oder multiplen Tochterkolonien.

Im folgenden wird untersucht:

1. Ursachen und Voraussetzungen für die Knopfbildung der Enteritissalmonellen,
2. die Fähigkeit zur Knopfbildung einer größeren Zahl von Salmonellastämmen auf ENDO-Agar; und
3. erfolgt Darstellung der Knopfbildung unter verschiedenen Bedingungen durch Photographien von Bakterienkolonien und deren Mediosagittalschnitten.

B PROBLEMSTELLUNG UND EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. MATERIAL UND METHODEN

1. Bakterienstämme

Untersucht wurden 199 Enteritissalmonellen der Serogruppen B - G, L und P, 70 Typhus-, zwei Paratyphus A-, 36 Paratyphus B-Stämme und ein Paratyphus C-Stamm, also insgesamt 308 Salmonellastämme, die zu 42 verschiedenen Serotypen gehören.

101 Stämme sind der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin entnommen. 81 weitere, hauptsächlich bei Fluß- und Abwasseruntersuchungen desselben Instituts gefundene Stämme wurden gleich nach ihrer Isolierung untersucht. Die restlichen 126 Stämme, bei Untersuchungen von Kranken, Dauerausscheidern und Keimträgern gewonnen, wurden freundlicherweise vom Medizinaluntersuchungsamt I Berlin (Leiter: Prof. Dr. med. B. Schmidt) zur Verfügung gestellt.

2. Nährböden

a) ENDO-Agar und andere Nährmedien

Die Zusammensetzung des bei diesen Untersuchungen verwendeten Milchzucker-Fuchsin-Sulfit-Agars weicht etwas von den Originalangaben ENDOS (14) ab.

Es wird ein Pferdefleischwasseragar mit nur 2 % Agar und dem pH-Wert 7,2 hergestellt. Einem Liter werden dann 5 ml einer alkoholischen Fuchsinlösung, 15 g Milchzucker (statt 10 g) und 5 g Natriumsulfit (statt 2,5 g) zugefügt.

Das Wachstum der Salmonellen auf ENDO-Agar wird dem auf gewöhnlichem Fleischwasseragar gegenübergestellt. Da sich deutliche Unterschiede ergeben, wird zunächst das Wachstum der Keime auf dem hier verwendeten ENDO-Agar und auf dem des Medizinaluntersuchungsamtes I verglichen, der nur 1 ml alkoholische Fuchsinlösung und nur 1 g Natriumsulfit pro Liter enthält.

Zur Feststellung, ob die Zusammensetzung des ENDO-Agars für die beobachtete Knopfbildung verantwortlich ist, werden Gehalt und Zusammensetzung der einzelnen Substanzen des Nährbodens geändert. Außerdem werden an Stelle des Natriumsulfits andere reduzierende Substanzen geprüft, nämlich

a) Kalium-,

b) Ammoniumsulfit. (Diese beiden Substanzen konnten nur in Lösung bezogen werden (RIEDEL-DE HAEN). Andere Sulfite sind schwer löslich (24) und werden deshalb nicht verwendet.) - Da die schweflige Säure und ihre Salze zu den Reduktionsmitteln gehören (24), werden weitere reduzierend wirkende Substanzen in der von HALLMANN (19) angegebenen Dosierung dem Agar zugesetzt und zwar

c) Natriumformiat (rein, entwässert, RIEDEL-DE HAEN),

d) Indigosulfonat (Kaliumsalz, E. MERCK),

e) Natriumthioglykolat (BAYER, Leverkusen) und

f) l-Cystein (SCHUCHARDT, München).

Schließlich werden an Stelle des Sulfits andere schwefelhaltige Substanzen verwendet, nämlich

a) Natriumthiosulfat (pro analysi, E. MERCK) und

b) Natriumsulfat (wasserfrei, pro analysi, E. MERCK).

b) Änderung des pH-Wertes der Nährböden

Der 0,1 % Natriumsulfit enthaltende Nähragar wird auf die pH-Werte 6, 7, 7,5 und 8 eingestellt (Spezial-Indikatorpapier MERCK (25) für die Bereiche pH 5,4 - 7,0, 6,4 - 8,0 und 8,3 - 10,0).

Ungepufferter Fleischwasseragar mit der doppelten Konzentration aller seiner Bestandteile (also 2 % Fleischextrakt BRUNNENGRÄBER, 2 % Pepton St BRUNNENGRÄBER, 0,6 % Kochsalz, 4 % Agar-Agar und 0,2 % Natriumsulfit) wird mit n/10 HCl bzw. n NaOH auf pH 6, 7, 7,5 und 8 eingestellt und autoklaviert. Dann wird der Agar mit der gleichen Menge einer geeigneten 0,1molaren, sterilisierten Phosphatpufferlösung nach SÖRENSEN (19, S. 61) mit dem pH 6, 7, 7,5 und 8 verdünnt, sodaß normal konzentrierter Nähragar mit 0,05molarer Pufferkonzentration (58) resultiert.

Mit einer sterilen Pipette werden einige Tropfen aus dem fertigen, noch flüssigen Agar entnommen und der pH-Wert kontrolliert. (Der pH 6-Agar hat einen helleren Farbton als der neutrale und alkalische. Der letzte ist etwas getrübt.) - Nach dem Erstarren des Agars wird das pH in je einer Probeplatte noch einmal geprüft. Dazu wird das Indikatorpapier mit destilliertem Wasser angefeuchtet und der Nährbodenoberfläche aufgelegt. Bewertet wird die Verfärbung der Unterseite des Streifens.

c) Änderung der Feuchte und der Agarkonzentration

Zunächst wird das Bakterienwachstum bei großer Luftfeuchte beobachtet. Auf die bei der Bebrütung unten liegenden Deckel der Petrischalen werden je zwei 6 x 6 cm^2 große, feuchte Filterpapierstreifen gelegt. Da es bei dieser Versuchsanordnung jedoch zu einem ausgedehnten Flächenwachstum der Bakterienkolonien kommt, werden in einem weiteren Versuch jeweils mehrere ENDO-Platten übereinander in eine Glasschale gestellt, deren Boden mit feuchter Watte ausgelegt ist, und mit einem großen Glasgefäß (umgekehrtes "Mäuseglas") überstülpt (33).

Um den Platten möglichst viel Feuchtigkeit zu entziehen, werden sie während ihres 24-stündigen Aufenthaltes in dem belüfteten Brutraum (37° C) nicht ganz geschlossen. Daneben werden andere Platten nur während der ersten sechs Stunden ein wenig offengehalten. Zum Vergleich dienen normal bebrütete ENDO-Platten.

Da die Agarkonzentration auch einen Einfluß auf die Feuchte (33) und auf das Bakterienwachstum hat (38), werden 0,1 % Natriumsulfit enthaltende Nähragarplatten mit 1,5, 2, 3 und 4 % Agar-Agar untersucht. - Schließlich sei in diesem Zusammenhang noch vermerkt, daß die Nährplatten vor der Beimpfung und Bebrütung im allgemeinen 1/2 bis 3/4 Stunden im Brutraum (37° C) oder 1 1/2 bis 2 Stunden bei Zimmertemperatur zum Trocknen aufgestellt wurden.

d) Unterschiedliche Nährbodenhöhe

Petrischalen mit gleichem Durchmesser (8,8 cm) und flachem, nicht gewölbtem Boden werden mit 7,5, 15 bzw. 35 ml flüssigen ENDO-Agars beschickt. Diesen Mengen entsprechen Nährbodenhöhen von 1,2, 2,5 bzw. 6 mm. Die Schalen, denen nur 7,5 ml zugeführt werden, wurden vorher erwärmt, damit sich der Agar vor der Erstarrung gleichmäßig verteilen kann.

3. Impftechnik

Die Nährbodenoberfläche wird mit Platinösen so fraktioniert beimpft, daß sich auf einer Nährplatte neben dicht stehenden, sich gegenseitig im Wachstum beeinflussenden Bakterienkolonien auch weit voneinander entfernt liegende ohne gegenseitige Beeinflussung entwickeln.
In einem besonderen Versuch werden Anteile des Knopfes und des Kolonierandes getrennt mit einer Stecknadelspitze unter Lupenkontrolle auf eine neue ENDO-Platte aufgetragen und mit der Öse fraktioniert ausgestrichen.
Um den Einfluß der Dichte des Koloniewachstums auf die Knopfbildung deutlich zu machen, wird mit dem Ende eines ausgezogenen Glasfadens (BIERKOWSKI (2)) eine ganz geringe Menge von je einer Kolonie mit und ohne Knopf abgenommen und eine ENDO-Platte mit untergeklebtem Millimeterpapier im Abstand von 1 mm (in 1 cm^2) und 10 mm unter Kontrolle der Lupe punktförmig beimpft.

4. Bebrütungstemperatur und -dauer

Die beimpften Nährböden werden im allgemeinen 24 Stunden einer Temperatur von 37° C ausgesetzt und anschließend bei Zimmertemperatur aufgehoben. Das Koloniewachstum wird nach der Bebrütung und dann nach einem, zwei und sieben Tagen beobachtet.
Um die Abhängigkeit der Kolonieform von der Temperatur zu studieren, werden ENDO-Platten gleicher Nährbodenhöhe bei 22°, 37° und 45° C inkubiert.
Die Kolonien werden bei schräg auffallendem Licht mit einer sechsfach vergrößernden Lupe betrachtet.

5. Mediosagittalschnitte

Zur Darstellung der knopfbildenden und nicht knopfbildenden Salmonellen werden Längsschnitte der Kolonien angefertigt. Die hierbei verwendete Technik wird ausführlich beschrieben, da bei der Herstellung von Schnitten der Bakterienkolonien zunächst erhebliche Schwierigkeiten auftraten, die vermieden werden können, wenn die schließlich verwendete Technik benützt wird.
Die von STÖSS (57) angegebene Entnahmetechnik wird modifiziert angewendet. Anstelle des dort beschriebenen Tuscheringes wird nur ein halber Kreis um die Kolonie gelegt, an dessen Enden, der Koloniemitte entsprechend, zwei waagerechte Striche gezeichnet werden; dadurch wird beim Schneiden das Auffinden der Koloniemitte erleichtert.

Bei Anwendung der im Jahre 1953 von SCHWARZ und VESTER (56) für histologische Untersuchungen und 1955 von STÖSS (57) zur Herstellung von Bakterienkolonieschnitten sehr empfohlenen Einbettung in C r e m o l a n 60 entstehen Schwierigkeiten, die Schnitte einwandfrei zu strecken, worauf schon STÖSS (57) hinweist. Daher wird diese Methode wieder aufgegeben.

Die ebenfalls von STÖSS (57) angegebene Einbettungsmethode mit e v a k u i e r t e m P a r a f f i n w a c h s , die eine Modifikation der von ROMEIS (53) für histologische Untersuchungen beschriebenen Technik darstellt, führt zu besseren Ergebnissen. Zu Paraffin mit einem Erstarrungspunkt von ca. 56 - 58° C wird 2 g% gelbes Bienenwachs gegeben. Um dem Gemisch niedrigsiedende, die Schnittfähigkeit beeinträchtigende Bestandteile zu entziehen, wird es in einem Wasserbad auf 90° C erhitzt und über 10 Stunden mit einer LEYBOLD D_2-Vakuumpumpe evakuiert.

Vor der Einbettung in dem Paraffin-Wachs-Gemisch werden die Agarstücke 24 Stunden in 70%igem Äthylalkohol + 4%igem Formalin (57) fixiert (70 Teile 96%igen Äthylalkohols + 9,6 Teile 40%igen Formalins + 16,4 Teile destillierten Wassers (53)). ENDO-Agarblöcke färben sich dabei rot an.

Anschließend werden sie zweimal in 70%igem Äthylalkohol gewaschen und mit 80%igem, 96%igem und absolutem Äthylalkohol entwässert. Jeweils morgens und abends werden sie vorsichtig mit einer rechtwinklig umgebogenen Öse von einem Alkohol in den anderen übertragen. Damit das spezifisch schwerere Wasser sich absetzen kann, werden die Präparate in dem Alkohol auf Watte gelegt (53). Der Alkohol wird mit dreimal gewechseltem Methylbenzoat entfernt (53). Die Objekte, die zunächst

an der Oberfläche schwimmen, sinken nach einigen Stunden zu Boden und werden glasklar. Nach insgesamt 24 Stunden werden sie für je 30 Minuten in einmal ausgetauschtes Benzol und dann noch für eine Stunde in mit Paraffin gesättigtes Benzol gebracht (53), das in gut verschlossener Flasche im Brutschrank aufbewahrt wird. Schließlich kommen die Präparate zur Durchtränkung mit Paraffinwachs etwa 30 Stunden in einen auf 63 - 65° C erwärmten Thermostaten. In den ersten Stunden werden sie in eine zweite und später in eine dritte Paraffinschale übertragen.

Beim Einbetten werden die Agarstücke mit einer erwärmten Nadel so ausgerichtet, daß die Schnittebene parallel zu den beiden Tuschestrichen verläuft, die die Mitte der Kolonie kennzeichnen. Der Tuschhalbkreis steht senkrecht zur Schnittfläche und ist ihr abgewandt. Die Paraffinblöcke werden mit Wasser von 10 - 18° C gekühlt, ohne daß dabei ihre Oberfläche überspült wird (53).

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (E. LEITZ, Wetzlar) werden nach guter Kühlung (53) 1 - 2 µ dicke Schnitte hergestellt. Sie strecken sich gut auf 35 - 40° C warmem Wasser in einer Petrischale (53). Man muß allerdings vor der Anfertigung der Schnitte alles überstehende Paraffinwachs wegschneiden (53), sodaß das Messer nur das mit dem Einbettungsmittel durchtränkte Agarstück durchfährt; sonst wird der Agar mit dem darin enthaltenen Kolonieschnitt durch das ihn umgebende Paraffinwachs an der vollständigen Ausdehnung auf dem Wasser behindert. - Mit einem gesäuberten Objektträger, auf dem ein kleiner Tropfen Eiweißglyzerin fein verrieben worden ist, werden mehrere entfaltete Schnitte aufgefangen und über Nacht bei 45° C getrocknet (53)

Zur Koagulation der Eiweißschicht wird der Objektträger über der Sparflamme des Bunsenbrenners vorsichtig erhitzt, bis das Paraffinwachs gerade eben schmilzt (53). Vor der Färbung mit Methylenblau werden die Präparate nacheinander fünf Minuten in Xylol und absoluten Alkohol und zwei Minuten in 96-, 80- und 60%igen Alkohol gebracht (53). Nach der Anfärbung werden sie kurz mit Wasser gespült, an der Luft getrocknet, in Xylol übertragen und anschließend in Caedax (E. MERCK, Darmstadt) eingebettet.

6. Photographien

a) Die Plattenkulturen werden durch ein Stereo-Mikroskop (Carl ZEISS) mit aufgesetzter Contax (ZEISS IKON) photographiert. Die Wuchsplatten werden dabei schräg gestellt, sodaß sie zur Waagerechten einen Winkel von etwa 35° bilden; jetzt kommen bei Beleuchtung mit Durchlicht und schräg von unten auftreffendem Auflicht (Niedervoltleuchte) die Knöpfe besonders gut zur Darstellung. Das Durchlicht läßt den Knopf wegen seiner größeren Bakterienmenge dunkler als den übrigen Teil der Kolonie erscheinen.
Die mikroskopische Vergrößerung ist 6,3fach (Trommelstellung 6, Okular 10 x).
Belichtungszeit: 1 sec (Agfa Isopan IF 17/10° DIN, Ultrafeinkornentwickler (Tetanal, Hamburg-Berlin)).
Nachträglich werden die Bilder vierfach vergrößert (Abb. 44 und 45 auf Tafel 10 und Abb. 50 und 51 auf Tafel 11 nur dreifach). Die Gesamtvergrößerung ist bei einem Kamerafaktor von 0,4 also etwa 10 : 1 (bzw. 8 : 1).

b) Die Kolonieschnitte werden mit dem Mikroskop Aristophot LEITZ (Okular 6 x, Objektiv 10 : 1) und der Leica (Kamerafaktor ca. 0,43) auf dem gleichen Film wie oben (Belichtungszeit 2 sec) aufgenommen und nachträglich 3,4fach vergrößert. Der Abbildungsmaßstab ist also etwa 90 : 1.

II. E R G E B N I S S E

1. B e e i n f l u s s u n g d e r K n o p f b i l d u n g d u r c h :

a) E N D O - A g a r u n d a n d e r e N ä h r m e d i e n

Salmonellen wachsen auf normalem Nähragar im allgemeinen in Form von gewölbten, runden, glänzenden, farblosen, beinahe durchsichtigen Kolonien (1, 9, 34), die nach eintägiger Bebrütung bei 37° C einen Durchmesser von 1,5 - 2,5 mm haben (58).

Auf ENDO-Agar entstehen farblose bis leicht rosa getönte Kolonien (4), die - wie im folgenden gezeigt werden soll - teilweise einen zentralen Knopf bilden können.

T a b e l l e 1 bestätigt die von SCHMIDT und LENK (54) gemachten Beobachtungen. Auf ENDO-Agar bildeten die Enteritis-Salmonellen einschließlich des S. java-Stammes Knöpfe, während Typhus- und Paratyphus-Keime solche missen ließen. Die Tatsache, daß auf gewöhnlichem Nähragar keinerlei Knopfbildung wahrzunehmen war, ließ annehmen, daß der für die Knopfbildung verantwortliche Faktor in der Zusammensetzung des Nährbodens zu suchen war. Welches dieser Faktor war, sollte im folgenden geklärt werden, indem die im ENDO-Agar vorhandenen verschiedenen Substanzen in der Menge verändert oder zum Teil weggelassen wurden.

Verwendete man ENDO-Agar ohne Zusatz von Laktose, so wurde dadurch die Knopfbildung nicht beeinflußt, wie umgekehrt die Zugabe von Laktose zu gewöhnlichem Nähragar kein Knopfwachs-

tum hervorrief. Die Laktose konnte somit als Knopfbildung anregender Faktor ausgeschieden werden.

Tabelle 1

Vergleich zwischen Nähragar und ENDO-Agar in Bezug auf die Knopfbildung von Salmonellen

Stamm	Nr.	Bebrütungszeit			
		24 h bei 37° C,		anschließend 24 h bei Zimmertemperatur	
		Knopfbildung auf			
		Agar	ENDO	Agar	ENDO
S. paratyphi A	PB 1801	-	-	-	-
S. paratyphi B	1713	-	-	-	-
S. paratyphi C	Hf 3	-	-	-	-
S. typhi	2475	-	-	-	-
S. java	PB 1344/b	-	+	-	++
S. saint-paul	Va. 57/1	-	+	-	+
S. typhi murium	B 31 VII/5	-	+	-	+
S. newport	C 1	-	+	-	++
S. enteritidis	Va. 57/5	-	+	-	++
S. panama	D 1	-	+	-	++
S. give	E 28	-	+	-	++

Erläuterung: Auch wenn nicht alle Kolonien eines Bakterienstammes auf einer Nährplatte Knöpfe haben, wird er als Knopfbildner bezeichnet.

- = flache Kolonien ohne Knopf,

+ = Kolonien mit Knopf,

++ = Kolonien mit besonders deutlichem Knopf.

Daraufhin wurde aus dem ENDO-Agar neben der Laktose noch die alkoholische Fuchsinlösung fortgelassen. Trotzdem bildeten sich deutliche Knöpfe.

Verzichtete man jedoch auf den Zusatz von N a t r i u m - s u l f i t , so blieb die Knopfbildung aus. Offenbar war das Natriumsulfit für die Entstehung der Knöpfe verantwortlich. Das wurde ganz deutlich bei einem Vergleich zwischen Nähragar, dem 0,5 % Natriumsulfit hinzugefügt worden war, und Nähragar ohne Zusatz. Wie erwartet bildeten sich nur auf dem Sulfitagar deutliche Knöpfe.

Nachdem festgestellt worden war, daß die Knopfbildung von dem Natriumsulfit abhängig ist, sollte seine dafür optimale Konzentration ermittelt werden. Es wurde das Wachstum auf 0,01, 0,1 und 1 g% Natriumsulfit enthaltendem Nähragar beobachtet und das Ergebnis in T a b e l l e 2 zusammengestellt. Nur auf dem 0,1%igen Sulfitagar bildeten alle Stämme (bis auf 3 Ausnahmen, die auch bei den übrigen Chargen jegliche Knopfbildung missen ließen) deutliche, die meisten sogar besonders stark hervortretende Knöpfe. Die Sulfitkonzentration von 0,01 % war zu gering, die von 1% zu groß. Allerdings erschienen auf dem 1%igen Sulfitagar zwei Tage nach der Bebrütung schöne Knöpfe, auf 0,01 % Sulfitagar aber nicht. - Die Kolonien hatten bei größerer Sulfitkonzentration einen kleineren Durchmesser. Offenbar hemmt Natriumsulfit das Bakterienwachstum.

Die hier wiedergegebenen Resultate sind auch in den photographischen Tafeln dargestellt. Alle auf Tafel 7 abgebildeten Kolonien von S. java, S. enteritidis und S. saintpaul zeigen nur bei den Agarplatten mit Zusatz von Natriumsulfit Knöpfe.

Tabelle 2

Bedeutung der Natriumsulfitkonzentration für die Knopfbildung (24stündige Bebrütung bei 37° C)

Stamm	Nr.	Natriumsulfit in g%		
		0,01	0,1	1
S. paratyphi B	PB 1801	-	-	-
S. typhi	2475	-	-	-
S. java	PB 1344/b	-	++	-
S. java	O 529	-	++	-
S. saint-paul	Va. 57/1	+	++	+
S. typhi murium	B 31 VII/5	+	+	-
S. potsdam	34/60	-	++	+
S. newport	C 1	-	++	+
S. kottbus	17/60	-	++	-
S. enteritidis	Va. 57/5	-	++	+
S. enteritidis	Ac 49	-	++	-
S. panama	D 1	+	++	-
S. panama	Va. 60/6	-	-	-
S. give	E 28	-	++	-
S. give	50/60	-	++	-
S. aberdeen	F 3	-	++	+

Erläuterung: - = kein Knopf, + = Knopf,
++ = besonders hervorragender Knopf

Der folgende Abschnitt befaßt sich mit der Frage, ob außer dem des Natriums andere Sulfite und reduzierende Substanzen die Knopfbildung auslösen können. Wenn auch andere Sulfite dazu fähig sind,

müßte der für die Knopfentstehung verantwortliche Faktor im Sulfit-Ion zu suchen sein. Tatsächlich bildeten sich auch auf Nähragar mit Kalium- bzw. Ammoniumsulfit Knöpfe, wie aus der T a b e l l e 3 zu ersehen ist.

T a b e l l e 3

Knopfbildung bei Zusatz verschiedener Sulfite zum Nähragar

(Agar mit 0,1 g% Sulfit, 24 h Bebrütung bei 37° C)

Stamm	Nr.	Na_2SO_3	K_2SO_3	$(NH_4)_2SO_3$	kein Sulfit	andere reduz. Subst. x)
S. paratyphi A	PB 1801	-	-	-	-	xx)
S. paratyphi B	1713	-	-	-	-	-
S. paratyphi C	Hf 3	-	-	-	-	xx)
S. typhi	2475	-	-	-	-	-
S. java	PB 1344/b	++	++	++	-	-
S. saint-paul	Va. 57/1	++	+	-	-	-
S. typhi murium	B 31VII/5	+	+	-	-	-
S. thompson	Va. 58/8	++	++	+	-	-
S. newport	C 1	+	+	-	-	-
S. enteritidis	Va. 57/5	++	++	++	-	-
S. panama	D 1	++	++	++	-	-
S. give	E 28	+	++	-	-	-

Erläuterung: - = kein Knopf, + = Knopf,

++ = besonders hervorragender Knopf.

x) Natriumformiat, indigosulfosaures Kalium, Natriumthioglykolat und l-Cystein.

xx) nicht geprüft

Kaliumsulfit hatte dieselbe Wirkung wie Natriumsulfit. Warum einige Stämme auf dem Ammoniumsulfit-Agar keine Knöpfe bildeten, ist nicht erklärlich. Einen Tag nach der Bebrütung jedoch waren auch bei S. saint-paul und S. enteritidis auf Ammoniumsulfit-Agar Knöpfe zu sehen, bei S. newport Andeutungen davon.

Da die Sulfite zu den Reduktionsmitteln gehören (24), sollte der Einfluß auch einiger anderer reduzierender Substrate auf die Knopfbildung untersucht werden (Natriumformiat (0,5 %), indigodisulfosaures Kalium (0,1 %), Natriumthioglykolat (0,1 %) und l-Cystein (0,075 %). Keine der geprüften Substanzen rief in der angegebenen Konzentration Knopfbildung hervor (Tab. 3).

Bei Verwendung von Natriumsulfit soll daran erinnert werden, daß Typhus-Stämme in Zwergformen wachsen können und erst nach dem Zusatz von Natriumsulfit zu normaler Koloniegröße auswachsen (26, 28, 61). Dafür verantwortlich gemacht wird sein Gehalt an Schwefel (61), denn Natriumthiosulfat hat die gleiche Wirkung (26, 28, 61). Hat diese Substanz auch einen Einfluß auf die Knopfbildung?

Um diese Frage zu beantworten, wurde das Wachstum der Keime auf Agarplatten mit einem Zusatz von 0,1 und 0,5 g% Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3 + 5\ H_2O$) mit dem Wachstum auf ENDO-Platten verglichen. Das Ergebnis war unterschiedlich. Die Paratyphus B- und Typhus-Stämme bildeten keine Knöpfe. Von den 15 getesteten Enteritis-Stämmen ließen 10 auf den Thiosulfat-Platten ebenfalls Knöpfe missen, während die restlichen 5 (S. java PB 1344/b und O 529, S. typhi murium B VII/5 im Gegensatz zu S. typhi murium 9/60, S. panama D 1 und S.

aberdeen F 3) Knöpfe hervorbrachten, die allerdings nicht so deutlich wie auf den ENDO-Platten waren. Wegen des großen Unterschieds der Koloniebilder auf den Thiosulfat- und ENDO-Platten darf wohl angenommen werden, daß die Knopfbildung nicht auf den in beiden Substanzen enthaltenen Schwefel zurückzuführen ist.
Auch ein Zusatz von Natriumsulfat (0,1 g%) zum Agar bewirkte keine Knopfbildung.

b) pH der Nährböden

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß das Natriumsulfit von entscheidender Bedeutung für die Knopfbildung ist, sollte festgestellt werden, ob darauf nicht auch andere Faktoren begünstigend oder hemmend einwirken.
Zunächst wurde das Koloniewachstum bei verschiedenem pH beobachtet. Da die Schleim- und Schleimwallbildung der Paratyphus B-Bakterien durch stärkere alkalische Reaktion begünstigt werden (33) und sich die Entwicklung der für Breslau-Bakterien charakteristischen Radspeichenstruktur gerade umgekehrt verhält (6), wurde auch ein Einfluß des pH auf die Knopfbildung angenommen. Diese Vermutung bestätigte sich nicht.
Auf dem Natriumsulfit(0,1)-Agar mit pH 6 erfolgte kein Bakterienwachstum. Die Kolonieformen bei pH 7, 7,5 und 8 unterschieden sich kaum voneinander. Typhus- und Paratyphus A-, B- und C-Keime wuchsen ohne Knopfbildung. Von den 16 geprüften Enteritisstämmen bildeten 4 bei pH 8 zunächst gar keine oder weniger deutliche Knöpfe als bei pH 7 und 7,5. Ein bis zwei Tage nach der Bebrütung waren jedoch bis auf

einen Stamm bei pH 8 auf allen Platten gleich schöne Knöpfe zu sehen.

d) B e b r ü t u n g s t e m p e r a t u r

Neben dem pH-Wert ist auch die Temperatur für das Wachstum der Salmonellen im allgemeinen (58) und für die Schleimwallbildung der Paratyphus B-Bakterien im besonderen von Bedeutung (33). Deshalb wurde auch der Einfluß der Bebrütungstemperatur auf die Entstehung der Salmonella-Knöpfe untersucht (T a b e l l e 4).

Es wurden 20 Salmonellastämme auf ENDO-Agar überimpft und bei 22°, 37° und 45° C bebrütet. Da sich die Salmonellen bei 22° C verhältnismäßig langsam vermehren, wurden die Kolonien erst nach h 48 Stunden beurteilt, wenn sie ungefähr so groß sind wie die bei 37° C inkubierten Stämme nach 24 Stunden.

Die Paratyphus- und Typhuskolonien bildeten weder bei 22° noch bei 37° oder 45° C Knöpfe. Die Typhuskolonien waren bei 45° C überhaupt erst nach einigen Tagen mit bloßem Auge sichtbar. - Die übrigen 16 Enteritiserregerstämme zeigten alle bis auf zwei Ausnahmen nach eintägiger Bebrütung bei 37° deutliche Knöpfe. Bei 22° hingegen entstanden bis auf eine Ausnahme keine Knöpfe, bei 45° nur bei zwei Stämmen.

Auf der photographischen Tafel 8 wird die Abhängigkeit der Knopfbildung von der Bebrütungstemperatur an drei Enteritisstämmen (S. typhi murium, S. enteritidis und S. java) demonstriert. Während bei 37° C schöne Knöpfe entstanden sind (Abb. 36 a, 37 a auf Tafel 8 und Abb. 5 a auf Tafel 2), sind

T a b e l l e 4

Knopfbildung bei verschiedener Temperatur (ENDO-Agar)

Stamm	Nr.	48 h bei 22° C	24 h bei 37° C	24 h bei 45° C
S. paratyphi A	PB 1801	-	-	-
S. paratyphi B	1713	-	-	-
S. paratyphi C	Hf 3	-	-	-
S. typhi	2475	-	-	-
S. java	PB 1344/b	-	++	-
S. java	O 529	-	++	-
S. saint-paul	Va. 57/1	-	++	++
S. typhi murium	B 31 VII/5	-	++	-
S. typhi murium	9/60	-	++	-
S. thompson	Va. 58/8	-	-	-
S. thompson	32/60	-	++	-
S. potsdam	34/60	-	++	-
S. newport	C 1	-	++	-
S. kottbus	17/60	-	++	-
S. manchester	13/60	-	++	-
S. enteritidis	Ac 49	-	++	-
S. panama	D 1	+	++	-
S. give	E 28	-	-	-
S. give	50/60	-	++	-
S. aberdeen	F 3	-	++	(+)

Erläuterung: - = kein Knopf, (+) = stark gewölbte Kolonie,
+ = Knopf, ++ = besonders deutlicher Knopf

die bei 45° (Abb. 36 b, 37 b und 38 a) und bei 22° (Abb. 36 c, 37 c und 38 b) gewachsenen Kolonien ganz flach.

Nach längerer Bebrütungszeit (48 Stunden) entstanden auch bei 45° Knöpfe. Bei 22° konnten sich nach mehreren Tagen, wenn die Kolonien schon wesentlich größer als nach eintägiger Inkubation bei 37° waren, auch Knöpfe bilden. Sie waren dann jedoch meistens weniger ausgeprägt als die bei 37° entstandenen.

Eine Knopfbildung kam aber immer nur dann zustande, wenn Na_2SO_3 im Nährboden enthalten war, womit der Vorrang des Natriumsulfits bei diesem Phänomen unterstrichen wird.

d) Unterschiedliche Feuchte

Da die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien auch von der Feuchte abhängt (33), soll im folgenden Abschnitt ihr Einfluß auf die Knopfbildung bei Salmonellen geprüft werden.

1. Große Luftfeuchte.

Die Deckel der ENDO-Platten wurden mit angefeuchteten Filterpapierstreifen ausgelegt, sodaß sich die Bakterien bei größtmöglicher Luftfeuchte vermehren konnten. Dabei wuchsen die meisten Teststämme flach in die Breite. Die Kolonien sahen teilweise flatterförmig aus und konnten miteinander verschmelzen. Aus dem Bakterienrasen ragten bei fast allen geprüften Enteritissalmonellen mehrere kuppelförmige Erhabenheiten, die sicherlich Kolonieknöpfen bei normaler Bebrütung entsprachen. Die Paratyphus- und Typhusbakterienkolonien dagegen waren flach und ohne Erhebungen.

In einem anderen Versuch waren die in üblicher Weise getrockneten und beimpften ENDO-Platten bei der Bebrütung (37° C) von einem Glasgefäß umgeben, dessen Boden mit feuchter Watte belegt war. Die geprüften 20 Salmonellastämme unterschieden sich fast gar nicht von den zur Kontrolle normal bebrüteten. Nur zwei Stämme zeigten zunächst allein auf den Platten mit der größeren Luftfeuchtigkeit Knöpfe. Einen Tag nach der 24stündigen Bebrütung jedoch waren auf den Kontrollplatten ebensolche Knöpfe zu sehen.

2. Geringe Feuchte.

Wurden die ENDO-Platten bei der Bebrütung (37° C) nicht ganz geschlossen, sodaß ständig Wasser verdunsten konnte, dann wurde das Wachstum der Kolonien deutlich gehemmt. Ihr Durchmesser war geringer als bei den Kolonien der normal bebrüteten Kontrollplatten. Durch den Wasserverlust verringerte sich die Nährbodenhöhe, bis schließlich eine ganz dünne Nährbodenschicht übrigblieb. Teilweise war der Agar infolge der Schrumpfung eingerissen. Die Deckel der Petrischalen waren trocken, während sie bei den Kontrollplatten nach 24 Stunden noch Wassertröpfchen aufwiesen.

Wie erwartet bildeten die S. paratyphi B-Kolonien auch auf den ausgetrockneten Platten keine Knöpfe. Wenn die Kolonien infolge der Wachstumshemmung nicht zu klein waren (unter 1 mm Durchmesser), ließen die untersuchten Enteritissalmonellastämme zwar größtenteils Knöpfe erkennen, jedoch waren diese weniger deutlich als nach normaler Bebrütung.

e) V e r s c h i e d e n e
A g a r k o n z e n t r a t i o n

Da auch die Agarkonzentration des Nährbodens nicht ohne Einfluß auf das Bakterienwachstum ist (38), - so ist z. B. zur Entwicklung deutlicher Schleimwälle ein bestimmter Prozentgehalt an Agar notwendig (33) -, wurde im folgenden Versuch die Menge des Agars variiert.
Weder auf den 1,5 und 2 %, noch auf den 3 und 4 % Agar enthaltenden Sulfit(0,1)-Platten waren die getesteten

Paratyphus- und Typhusstämme nach 24 h bei 37° C mit einem Knopf gewachsen. Die 16 geprüften Salmonellastämme der Enteritisgruppe dagegen entwickelten auf allen Platten Knöpfe. Am schönsten kamen sie auf 1,5- und 2%igem Agar heraus. (Nur 2 Stämme bildeten auf dem 2%igen Agar weniger deutliche Knöpfe als auf dem 1,5%igen.) Eine rauhe Oberfläche wiesen die meisten Kolonien auf dem 4%igen Agar auf. Daß auch sie typische Knöpfe hervorbringen können, kommt an der Abb. 47 auf Tafel 10 zum Ausdruck. Bei mehreren Stämmen jedoch war die Knopfbildung weniger ausgeprägt als auf den Platten mit geringerem Agargehalt.

f) Nährbodenhöhe und Dichte des Koloniewachstums

Neben den bereits erwähnten Faktoren ist auch die Stärke der Nährbodenschicht für das Bakterienwachstum und damit für die Kolonieform von Bedeutung (38). Im folgenden Abschnitt wird zunächst über den Einfluß der Nährbodenhöhe auf die Knopfbildung von Salmonellen berichtet.
Am deutlichsten war die Knopfbildung bei geringer Höhe der ENDO-Agarschicht. Auf den 15 ml- und besonders auf den 7,5 ml-Platten waren die Knöpfe besser ausgebildet als auf den 35 ml-Platten.
Das wird an einem Stamm (S. panama) auf den Abbildungen 39 a - d (Tafel 9) anschaulich gemacht. Während die Kolonien der 7,5- und 15 ml-Platten deutliche Knöpfe zeigen (Abb. 39 a und b), haben entsprechend gelagerte Kolonien der 35 ml-Platte keinen Knopf (Abo. 39 c). Bei ganz dicht nebeneinander gelegenen Kolonien, die ringsherum von

Bakterienrasen umgeben sind, entwickeln sich jedoch auch auf derselben dicken Nährbodenschicht Knöpfe (Abb. 39 d). Dagegen haben ebenfalls ganz eng nebeneinander stehende und sich im Wachstum gegenseitig beeinflussende Kolonien von Salm. paratyphi B keine Knöpfe (Abb. 40).

Häufig zeigen nicht alle Kolonien eines Enteritisstammes auf einer ENDO-Platte Knöpfe. Oft sind sie zunächst nur bei dicht stehenden oder bei schon miteinander verschmolzenen Kolonien zu sehen, während sie bei weiter voneinander entfernten fehlen. Dieses Verhalten wird an Aufnahmen von S. aberdeen demonstriert. Die Abbildungen 29 a und b (Tafel 6) sind Ausschnitte derselben ENDO-Platte. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° C wiesen nur dicht gelagerte Kolonien Knöpfe auf (Abb. 29 a). Die isoliert stehenden knopflosen Kolonien (Abb. 29 b) entwickelten jedoch im Laufe des folgenden Tages bei Zimmertemperatur ebenfalls deutliche Knöpfe (Abb. 29 c).

Ließe sich der Einfluß der D i c h t e d e s K o l o n i e w a c h s t u m s auf die Knopfbildung auch experimentell nachprüfen?

Auf den Abbildungen 41 und 42 a der Tafel 9 werden die Ergebnisse eines solchen Versuches dargestellt. Aus den mit dem Glasfaden auf die ENDO-Platte im Abstand von 1 mm getupften Punkten sind Kolonien mit deutlichen Knöpfen entstanden (Abb. 41, S. enteritidis, 24 h bei 37° C). An den in 10 mm Entfernung voneinander punktförmig beimpften Stellen auf derselben ENDO-Platte haben sich dagegen flache Kolonien ohne Knöpfe gebildet (Abb. 42 a). Bei weiterer

Beobachtung lassen auch diese inzwischen größer gewordenen Kolonien Knöpfe erkennen, die allerdings weniger deutlich sind (Abb. 42 b, 1 Tag bei 37° und 3 Tage bei 22° C). - (Nebenbei sei noch darauf hingewiesen, daß es sich bei diesem Versuch natürlich nicht um Einzell-Kolonien handeln konnte. Auf die komplizierte Herstellung von Einzell-Kulturen mit Hilfe des Mikromanipolators wurde verzichtet. Bei Verwendung der technisch einfacheren Glasfadenkapillartechnik zur Erzeugung von Einzell-Kolonien (BIERKOWSKI (2)) jedoch wäre man auch nicht sicher, ob gerade dicht nebeneinander liegende Kolonien wirklich Einzell-Kulturen wären. Weiter voneinander entfernte Kolonien aber können ebenso wie die nach routinemäßiger, fraktionierter Beimpfung der Nährplatten in großem Abstand voneinander entstandenen Kolonien Einzell-Kulturen sein.).

Die nach 24stündiger Bebrütung (37° C) noch knopflosen Kolonien der Enteritissalmonellen können also bei anschließendem Aufenthalt bei Zimmertemperatur noch Knöpfe hervorbringen (Abb. 29 b und c, Tafel 6). Dementsprechend werden nach 24 Stunden (37° C) bereits sichtbare Knöpfe einen Tag später (22° C) wesentlich deutlicher, was auf den Abbildungen 17 a und b (Tafel 4) gut zu sehen ist.

Mehrere Tage nach der Bebrütung können ausnahmsweise auch Paratyphusbakterienkolonien knopfartige Erhebungen zeigen, (angedeutet bei S. paratyphi B, ausgeprägter bei S. paratyphi C auf den Abbildungen 54 und 55, Tafel 11, 1 Tag 37° + 7 Tage 22° C).

Der Unterschied zu den Enteritiskolonien wird also bei alten Kulturen undeutlicher. - S. typhi-Kolonien haben gelegentlich schon ein bis zwei Tage nach Bebrütung Knöpfe, die allerdings meistens breit und wenig erhaben sind.

Nebenbei sei erwähnt, daß auch andere, nicht zu den Salmonellen gehörende Bakterien gelegentlich auf dem ENDO-Agar Knöpfe bilden können. Besonders schöne zeigen die Kolonien der Pseudomonas pyocyanea auf der Tafel 3 (Abb. 12 a, Kolonielängsschnitt auf Abb. 12 b) und der Escherichia coli auf der Tafel 6 (Abb. 32).

2. Weiterimpfung knopfloser Kolonien von Enteritis-Salmonellakeimen

Oft zeigen nicht alle Kolonien eines Enteritisstammes auf derselben ENDO-Platte einen Knopf. Es ergab sich daher die Frage, ob man durch Weiterimpfen knopfloser Kolonien Stämme züchten kann, die keine Knöpfe mehr bilden.
Untersucht wurden vier verschiedene Salmonellastämme (S. java O 529, S. potsdam 34/60, S. kottbus 17/60 und S. enteritidis Ac 49). Siebenmal hintereinander wurde nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C Material von knopflosen Kolonien auf neue ENDO-Platten fraktioniert überimpft. Jedesmal entwickelten sich nach 24 h bei 37° C wieder nebeneinander Kolonien mit und ohne Knopf (Abb. 28, Tafel 6). Ausnahmsweise hatten alle Kolonien über 1 mm Durchmesser auf einer ENDO-Platte Knöpfe (S. potsdam und S. kottbus). Wurde dann eine Knopfkolonie auf eine frische Platte überimpft, so entstanden auch wieder einige flache Kolonien ohne Knopf. - Das Verhältnis beider Kolonieformen zueinander auf einer Nährplatte war variabel. Unterschiede in Farbton und Koloniegröße waren nicht zu erkennen.

Wurden in einem besonderen Versuch Anteile des Knopfes und der Randpartie getrennt auf ENDO-Platten fraktioniert überimpft, so war nach eintägiger Bebrütung (37° C) kein Unterschied in der Kolonieform feststellbar. Es entstanden jedesmal wieder Kolonien mit und ohne Knopf.

3. Mischkultur von S. paratyphi B mit S. java bzw. mit S. enteritidis

Um zu beurteilen, mit welcher Sicherheit sich knopfbildende Kolonien von Enteritissalmonellen und knopflose Paratyphus B-Kolonien nebeneinander erkennen und voneinander unterscheiden lassen, wird experimentell eine Mischkultur hergestellt, wie sie in der Natur durchaus vorkommen kann.

Die serologisch und biochemisch genau untersuchten Salmonella java (PB 1344/b)- und S. enteritidis (Ac 49)-Stämme, die beide keine Schleimwälle bildeten (28), und S. paratyphi B (1713), ein Stamm, der regelmäßig deutliche Schleimwälle entwickelte, wurden getrennt in je einem Bouillonröhrchen 4 1/2 Stunden bei 37° C bebrütet. Dann wurden 5 ENDO-Platten mit S. paratyphi B und S. java und 5 weitere ENDO-Platten mit S. paratyphi B und S. enteritidis folgendermaßen beimpft. Auf jede Platte wurden mit je einer Öse der beiden Bouillonkulturen, die vermischt werden sollten, nebeneinander zwei Impfstriche gesetzt und mit ausgeglühter und erkalteter Öse gleichmäßig über die ganze Platte verteilt.

Bei 24stündiger Bebrütung entstanden, wie auf den Abb. 43 a und b (Tafel 10) zu sehen ist, große, flache Kolonien ohne Knopf neben kleineren mit Knopf. Insgesamt 53 knopftragende und 52 knopflose, isoliert stehende Kolonien wurden zur Prüfung der Schleimwallbildung auf Nähragar getupft, je 5 auf eine Platte. Wie erwartet bildeten alle geprüften Knopfkolonien k e i n e n Wall (Abb. 45), gehörten also zu S. java bzw. S. enteritidis.

Von den 52 getesteten flachen Kolonien ohne Knopf entwickelten 49 einen deutlichen Schleimwall (Abb. 44), waren also die aufgeimpften Paratyphus B-Kolonien. Nur drei knopflose Kolonien dieser Mischkultur erwiesen sich als wallnegativ, so daß sie im Gegensatz zu den 49 zuvor erwähnten nicht als Paratyphus B-Kolonien angesprochen werden konnten.

(Auf eine erneute serologische bzw. biochemische Prüfung wurde aus praktischen und technischen Gründen verzichtet, da sich der verwendete Paratyphus B-Stamm in vorangegangenen Versuchen ständig als guter Schleimwallbildner erwiesen hatte, während es bei den beiden Enteritis-Salmonellastämmen nie zu einer Schleimwallbildung gekommen war. Es blieb dabei jedoch unberücksichtigt, daß einerseits ein Paratyphus B-Stamm die Fähigkeit zur Wallbildung verlieren kann (43) und daß andererseits in seltenen Fällen schleimwallpositive S. enteritidis-Stämme vorkommen (28, 34). Sogar wallbildende d-Tartrat verzögert angreifende Stämme wurden schon beschrieben (62).)

Von 105 Kolonien waren nur 3 nicht richtig beurteilt worden, und zwar 3 flache Kolonien. Das ist nicht verwunderlich, denn - wie bereits erwähnt - bilden nicht alle Kolonien der Enteritissalmonellen auf einer ENDO-Platte schon nach 24-stündiger Bebrütung Knöpfe. - Hervorgehoben wird, daß die knopftragenden Kolonien stets Enteritissalmonellen waren.

Dieser Versuch zeigt erstens, wie brauchbar die Beachtung unterschiedlicher Kolonieformen für die Erkennung von Mischkulturen sein kann, und zweitens, mit welcher Sicherheit die Knopfbildung einer Kolonie f ü r Enteritissalmonellen und g e g e n Paratyphus B-Bakterien spricht.

4. P r ü f u n g d e r K n o p f b i l d u n g e i n e r g r ö ß e r e n Z a h l v o n S a l m o n e l l a s t ä m m e n a u f E N D O - A g a r

Um zu zeigen, daß die Knopfbildung nicht das Merkmal einer begrenzten Zahl und einiger Typen ist, wurde eine größere Zahl (= 199) von Enteritissalmonellen auf das Vorhandensein von Knöpfen geprüft. Ebenso wurden einige Paratyphus B- (= 36) und Typhusstämme (= 70) darauf untersucht, ob sie wirklich ohne Knopfbildung wachsen.

T a b e l l e 5 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Von 36 S. paratyphi B-Stämmen verschiedenen Ursprungs bildete kein einziger nach eintägiger Bebrütung bei 37° C Knöpfe. Nur 7 Stämme hatten nach anschließend 24stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur neben überwiegend knopflosen Kolonien einige wenige mit Knopf.

Bei 25 von 32 S. java-Stämmen entstanden nach 24 Stunden bei 37° C deutliche Knöpfe, bei der Mehrzahl (= 20) sogar besonders hervorragende. 6 Stämme hatten zu diesem Zeitpunkt noch keine Knopfkolonien, 1 Stamm nur fragliche. 24 Stunden später wiesen auch die Kolonien der letzten 7 Stämme Knöpfe auf.

Tabelle 5

Knopfbildung von Salmonellen auf ENDO-Agar

(24 Stunden bei 37° C und anschließend 24 Stunden bei Zimmertemperatur)

Gruppe (31)		Zahl	Herkunft	Bebrütungszeit 24 h 37°, anschliessend 24 h 22° C					
				Knopfbildung					
				+	(+)	-	+	(+)	-
A	S. paratyphi A	2	Laborstämme			2			2
B	S. paratyphi B	2	Patient			2			2
	"	27	Ausscheider			27	2		25
	"	2	Wasser			2			2
	"	2	Laborstämme			2			2
	", var. odense	3	"			3	2		1
	S. java	2	Patient	2			2		
	"	4	Wasser	4			4		
	"	26	Laborstämme	19	1	6	26		
	S. abony	2	Laborstämme	2			2		
	S. abortus bovis	5	"	1		4	2		3
	S. stanley	1	Wasser	1			1		
	S. saint-paul	1	"	1			1		
	"	1	Laborstamm	1			1		
	S. reading	1	Ausscheider	1			1		
	"	4	Wasser	4			4		

Erläuterung: - = keine Knopfbildung
(+) = fragliche Knopfbildung
+ = Knopfbildung

Gruppe	Getestete Stämme	Zahl	Herkunft	Bebrütungszeit 24 h 37°, anschliessend 24 h 22° C					
				Knopfbildung					
				+	(+)	-	+	(+)	-
B	S. derby	2	Wasser	2			2		
	"	1	Laborstamm	1			1		
	S. typhi murium	8	Patient	6	2		8		
	"	2	Ausscheider	2			2		
	"	9	Wasser	6	1	2	7	2	
	"	1	Laborstamm	1			1		
	", var. Kopenhagen	1		1			1		
	S. bredeney	1	Wasser	1			1		
	S. brandenburg	1	Patient			1		1	
	"	5	Wasser	4		1	4	1	
	S. heidelberg	3	Patient	2		1 x)	2		1
	"	3	Ausscheider			3 x)		1	2
	"	4	Wasser	4			4		
C 1	S. paratyphi C	1	Laborstamm			1			1
	S. braenderup	4	Laborstämme	4			4		
	S. montevideo	2	Ausscheider			2			2
	"	2	Laborstämme			2			2
	S. oranienburg	3	Wasser	3			3		
	S. thompson	2	"	2			2		
	"	1	Laborstamm	1			1		

x) Diese 4 Stämme stammen aus 2 Infektionsherden.

Gruppe	Getestete Stämme	Zahl	Herkunft	Bebrütungszeit 24 h 37°, anschliessend 24 h 22° C					
				Knopfbildung					
				+	(+)	-	+	(+)	-
C 1	S. potsdam	1	Wasser	1			1		
	S. infantis	2	Patient	1	1		2		
	"	3	Wasser	3			3		
	S. bareilly	3	Wasser	3			3		
	"	1	Laborstamm	1			1		
	S. tennessee	1	Wasser	1			1		
C 2	S. newport	1	Laborstamm	1			1		
	S. kottbus	2	Wasser	2			2		
	S. blockley	1	Patient		1			1	
	"	1	Laborstamm	1			1		
	S. manchester	2	Wasser	2			2		
	"	1	Laborstamm	1			1		
	S. bovis morbificans	2	Wasser	2			2		
		1	Laborstamm	1			1		
C 3	S. kentucky	1	Wasser	1			1		
D 1	S. typhi	22	Patient			22	7	9	6
	"	47	Ausscheider			47	22	7	18
	"	1	Laborstamm			1			1
	S. enteritidis	2	Wasser	2			2		
	"	1	Laborstamm	1			1		
	", var. jena	1	Ausscheider			1	1		

Gruppe	Getestete Stämme	Zahl	Herkunft	Bebrütungszeit 24 h 37°, anschliessend 24 h 22° C					
				Knopfbildung					
				+	(+)	-	+	(+)	-
D 1	S. panama	2	Wasser	1		1	1		1
	"	2	Laborstämme	1		1	1		1
E 1	S. anatum	5	Wasser	5			5		
	"	19	Laborstämme	16	2	1	18		1
	S. meleagridis	3	Wasser			3			3
	S. give	1	Patient	1			1		
	"	6	Wasser	6			6		
	"	3	Laborstämme	3			3		
	S. amager	11	Laborstämme	11			11		
E 2	S. newington	1	Wasser	1			1		
	S. new brunswick	2	Patient	2			2		
F	S. aberdeen	1	Wasser	1			1		
	"	5	Laborstämme	5			5		
	S. tel-hashomer	1	Wasser	1			1		
G 2	S. worthington	2	Wasser	2			2		
L	S. minnesota	1	Wasser	1			1		
	"	4	Laborstämme	3		1	3	1	
P	S. adelaide	1	Wasser	1			1		
	S. paratyphi B	36				36	4		32
	S. typhi	70				70	29	16	25
	Enteritis-Salmonellen	199		161	8	30	176	7	16

Von den weiteren 167 geprüften Enteritis-Salmonellastämmen bildeten 137 Kolonien mit Knopf, während 24 gar keine und 7 nur fragliche Knöpfe hervorbrachten. Nach einem Tag Zimmertemperaturaufenthalt hatten immer noch 16 Stämme keine Knopf-Kolonien, 7 nur Kolonien mit breitem, flachem Rand ohne deutlichen Knopf.

Von insgesamt 199 getesteten Enteritissalmonellen-Stämmen entwickelten also 162, d. h. 81 %, nach eintägiger Bebrütung bei 37° C Knöpfe, die restlichen 37 (19 %) gar keine oder nur fragliche. Einen Tag später hatten nur noch 23 Stämme (11 %) keine deutlichen Knöpfe.

Die Enteritissalmonellen, die nur knopflose Kolonien bildeten, gehörten zu 11 verschiedenen Serotypen und 6 differenten serologischen Untergruppen. Stämme ohne Knopfbildung fanden sich unter folgenden Serotypen anscheinend häufiger: S. abortus bovis (4 von 5 geprüften Stämmen), S. heidelberg (4 von 10 Stämmen), S. montevideo (alle 4 Teststämme), S. panama (2 von 4 Stämmen) und S. meleagridis (alle 3 Teststämme). - Die 4 S. heidelberg-Stämme ohne Knopfbildung stammen aus 2 Infektionsquellen.

Bis auf den nach 24 h Bebrütung teilweise geringeren Durchmesser und den fehlenden Schleimwall unterschieden sich die erwähnten Enteritissalmonellen ohne Knopfbildung in der Kolonieform nicht von den Paratyphus B-Kolonien.

Alle 70 getesteten S. typhi-Stämme ließen nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C keine einzige knopfförmige Kolonie erkennen. Nach anschließend eintägigem Aufenthalt bei etwa 22° C waren jedoch bei 29 Stämmen Knöpfe zu sehen, bei 16 Stämmen fragliche Knöpfe. Trotz der Ähnlichkeit mit den Knöpfen der Enteritissalmonellen unterschieden sie sich

doch von diesen durch eine gröbere, weniger zarte Form. Kolonien mit besonders deutlichen Knöpfen kamen überhaupt nicht vor.

Zusammengefaßt kam es zu folgendem Ergebnis:
Während alle geprüften Paratyphus- und Typhusbakterienstämme nach eintägiger Bebrütung (37° C) auf ENDO-Agar keine Knöpfe bildeten, wurden bei 81 % der Enteritissalmonellen knopftragende Kolonien festgestellt.
Nach weiterem Aufenthalt bei Zimmertemperatur konnten auch einige wenige Paratyphus- und zahlreiche Typhusstämme Knöpfe hervorbringen. Andererseits wurden die Knöpfe der Enteritisstämme im allgemeinen noch deutlicher und der Prozentsatz der knopfbildenden Stämme größer (89 %).

5. Sagittalschnitte und Photographien

In den vorangehenden Abschnitten wurde schon verschiedentlich auf die photographischen Aufnahmen hingewiesen. An dieser Stelle soll zusammenfassend eine Übersicht über die Ergebnisse der Schnitte und Photographien gegeben werden.

Auf den Tafeln 1, 2 und 3 sind neben den Kolonien verschiedener Salmonellen und eines Pseudomonas-Keimes deren Mediosagittalschnitte abgebildet. Die Paratyphus- und Typhus-Bakterienkolonien auf der Tafel 1 sind flach und ohne Knopf. Das wird durch die Längsschnitte bestätigt. Im Gegensatz dazu zeigen die Kolonien der Enteritissalmonellen auf den Tafeln 2 und 3 dunkel getönte, zentrale, knopfartige Vorwölbungen. Daß es sich dabei um keine

optische Täuschung handelt, wird durch die Längsschnitte einwandfrei bewiesen.

Die Schnitte lassen eine Dreischichtung erkennen, auf die schon STÖSS (37) und HENNEBERG (23) hingewiesen haben. "Die Schichtenbildung ist bei Bact. coli und bei den Salmonellen sehr stark ausgeprägt. Man kann von einer Basalschicht, einer Oberflächenschicht und mehreren Mittelschichten sprechen" (23). Die Feinstruktur der Schichten würde eingehend von STÖSS beschrieben (37). - Die Schichten der auf den Tafeln 2 und 3 abgebildeten Längsschnitte gehen ohne Unterbrechung in den zentralen Knopf über.

Vergleichsweise wird ein Pseudomonas pyocyanea-Stamm mit aufgeführt, der ebenfalls auf ENDO-Agar Knöpfe bildet und auf dem Schnitt eine Schichtung erkennen läßt (Abb. 12 a und b, Tafel 3). Der Kolonierand ist allerdings nicht glatt.

Die T a f e l n 4 b i s 6 enthalten Aufnahmen knopftragender Kolonien zahlreicher Serotypen, nach serologischen Gruppen geordnet (31). Es wird dabei deutlich, daß die Knopfbildung nicht auf einige wenige Salmonella-Typen beschränkt ist. Einige Abbildungen seien besonders beschrieben.

Die Auf Abb. 17 a (Tafel 4) nach 24stündiger Bebrütung (37° C) bereits sichtbaren Knöpfe sind nach anschließend eintägigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur noch viel deutlicher (Abb. 17 b).

Die Abb. 19 (Tafel 4) und 24 (Tafel 5) lassen sehr schöne Knöpfe im Bakterienkolonierasen erkennen.

Manchmal sind die Knöpfe zunächst nur bei dicht nebeneinander stehenden Kolonien und im Kolonierasen entwickelt

(Abb. 29 a, Tafel 6), während isoliert liegende Kolonien noch keine Knöpfe haben (Abb. 29 b). Einen Tag nach der Bebrütung zeigen auch sie Knöpfe (Abb. 29 c).
Anhangsweise wird ein auf ENDO-Agar knopfbildender Escherichia coli-Stamm abgebildet (Abb. 32), dessen Knöpfe dunkelrot gefärbt waren.

Auf der T a f e l 7 wird das Wachstum der Keime auf Agarplatten mit einem Zusatz von Natriumsulfit mit dem Wachstum auf gewöhnlichen Agarplatten verglichen. Die Kolonien auf den Sulfitplatten haben einen deutlichen Knopf und einen kleineren Durchmesser als entsprechend gelagerte Kolonien auf den Kontrollplatten. Weder weit voneinander entfernte (Abb. 33 b und 34 b) noch dicht nebeneinander liegende Kolonien (Abb. 33 c und 34 c) auf den Agarplatten ohne Sulfit haben Knöpfe. Die Kolonien auf Abb. 35 b weisen einen schmalen, ganz flachen Randsaum auf.

T a f e l 8 veranschaulicht den Einfluß der Bebrütungstemperatur auf die Knopfbildung. Deutliche Knöpfe sind nur bei 37° C entstanden (Abb. 36 a und 37 a).

Auf T a f e l 9 wird die Beeinflussung der Knopfbildung durch Nährbodenhöhe und Dichte des Koloniewachstums demonstriert.

Auf T a f e l 10 ist eine Mischkultur von S. paratyphi B und S. java dargestellt (Abb. 43 a und b). Dabei wird der Unterschied zwischen den großen, flachen Kolonien (S. paratyphi B) und den kleineren Knopfkolonien (S. java) besonders deutlich.

Die knopftragende Kolonie von S. kottbus in der Abb. 46 hat eine rauhe Randpartie. - Daß auch Kolonien mit rauher Oberfläche Knöpfe bilden können, ist auf der Abb. 47 zu sehen.

Auf der T a f e l 11 sind Radspeichenkolonien von S. typhi murium und S. enteritidis abgebildet (Abb. 48, 49 und 50). Bei der Kolonie der Abb. 49 hat die Fältelung auch das Zentrum ergriffen. An der Abb. 50 wird deutlich, daß die Speichenbildung durch Nachbarkolonien gehemmt wird.

Daß auch S. paratyphi B-Kolonien radspeichenähnliche Formen hervorbringen können, zeigt Abb. 52.
Eine auffallend schöne Radspeichenstruktur hat die auf Abb. 51 abgebildete, Laktose nicht vergärende Escherichia coli-Kolonie.
Nebenbei sei noch auf die besondere Kolonieform der Abb. 53 hingewiesen. An mehreren Stellen hat sich der Schleimwall von der übrigen Paratyphus B-Kolonie gelöst.
Abb. 54 stellt eine mehrere Tage alte Paratyphus B-Bakterienkolonie mit fraglicher, geringer Knopfbildung dar. Auf der letzten Abbildung ist ein ebenfalls mehrere Tage alter Paratyphus C-Stamm mit Knopfbildung zu sehen.

III. D I S K U S S I O N

1. U r s a c h e d e r K n o p f b i l d u n g

Verantwortlich für die Entwicklung zentral knopfartig erhabener Kolonien der Enteritissalmonellen auf dem ENDO-Agar ist das darin enthaltene Natriumsulfit. Aber auch andere Sulfite können, wie wir gesehen haben, Knopfbildung hervorrufen. - Der Wirkungsmechanismus ist unbekannt. Da das Sulfit die Kolonieform deutlich beeinflußt, darf auch eine Einwirkung auf die einzelne Bakterienzelle angenommen werden. Vielleicht reagiert es mit Bisulfidgruppen der Proteine (21).

Als Reduktionsmittel scheint es nicht zu wirken, denn andere reduzierende Substanzen (Natriumformiat, Indigosulfonat, Natriumthioglykolat, l-Cystein) haben keinen Einfluß auf die Knopfbildung.

Da die Knöpfe zunächst oft nur bei dicht nebeneinander liegenden Kolonien zu sehen sind, ferner auf ENDO-Agar geringer Schichthöhe besser hervorkommen und außerdem nach längerer Beobachtungszeit deutlicher werden, entsteht der Eindruck, daß Nährstoffmangel oder Ansammlung von Stoffwechselprodukten (44) von Bedeutung sind. Hiermit übereinstimmen würde die für Koloniewachstum (58) und Knopfbildung optimale Temperatur von 37° C.

Wenn auch der ENDO-Agar den Alterungsvorgang der Kolonien beschleunigt (48, 57), so darf er doch nicht als Mangelnährboden angesehen werden, der abnorme, als Degenerations-

erscheinung (60) aufzufassende Kolonieformen hervorbringt. Daß die Knöpfe bei Enteritis-Salmonellen durch einen Mischinfekt (18) bedingt sind, ist wenig wahrscheinlich, denn:

1. Die untersuchten Stämme waren Reinkulturen im allgemein gebräuchlichen Sinne, also "nicht durch Fremdkeime verunreinigt" (20).
2. Hatte ein Salmonellastamm auf einer ENDO-Platte nebeneinander knopftragende und knopflose Kolonien entwickelt und wurden dann nur die flachen Kolonien weiterverimpft, so entstanden jedesmal wieder Kolonien mit und ohne Knopf, ausnahmsweise sogar nur Knopfkolonien.
3. Abimpfungen vom Knopf und von der flachen Peripherie der Kolonie führten zu gleichen Ergebnissen. Es bildeten sich immer Kolonien mit und ohne Knopf.
4. Auf den Mediosagittalschnitten durch Kolonien mit Knopf ist deutlich zu erkennen, daß die bei Salmonellen (und E. coli) stark ausgeprägten Schichten (23, 39, 57) die ganze Kolonie gleichmäßig durchziehen und sich an der zentralen Vorwölbung (= Knopf) ohne Unterbrechung beteiligen. Demnach handelt es sich vermutlich nicht um eine etwa durch fremde Keime oder durch Aufspaltung bedingte Herdbildung (23). - Der Unterschied zu dem von MASSINI (39) dargestellten Schnitt durch eine E. coli-Kolonie mit Knötchen ist eindeutig. Die Knötchen wachsen aus der Tiefe der Kolonie, alle Schichten durchbrechend, an die Kolonieoberfläche.

2. Bedeutung der Knopfbildung

"Eine Koloniebildung der Mikroorganismen geschieht nicht wahllos als Anhäufung, sie unterliegt vielmehr einer für die betreffende Bakterienart spezifischen Ordnung" (HENNEBERG (22)). Knopfbildende Kolonien werden bei Salmonellen der Enteritisgruppe so häufig beobachtet, daß ein Zusammenhang zwischen dieser Kolonieform und den Enteritis-Salmonellen möglich zu sein scheint.

Wenn auch nach KAUFFMANN (28) eine Typendiagnose auf der Basis unterschiedlicher Wachstumsformen unmöglich ist, so kann die Wuchsform doch ein diagnostisches Hilfsmittel sein, wie wir es z. B. von der Schleimwallbildung und den Radspeichenkolonien her kennen.

Praktische Bedeutung kann die Knopfbildung z. B. für die Erkennung von S. java-Kulturen haben, die sich serologisch nicht von S. paratyphi B-Kulturen unterscheiden lassen (29). Zeigen die Kolonien nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C auf ENDO-Agar Knöpfe, so handelt es sich mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nicht um Paratyphus B-Bakterien.

Ein weiteres kulturmorphologisches Unterscheidungsmerkmal zwischen Paratyphus B- und Java-Kolonien ist die Radspeichenbildung, die ELKELES (12) und andere (17, 32, 40) als kennzeichnend für Enteritis Breslau-Bakterien angegeben hatten, und die BRANDIS (5) im Jahre 1948 bei d-Tartrat-positiven, schleimwallnegativen "Paratyphus B"-Stämmen, heute als S. java bezeichnet (29), beobachtet hatte.

Die Radspeichenstruktur ist zwar sehr kennzeichnend, kommt aber - im Gegensatz zur Knopfbildung - sehr selten vor (13). Bei alten Laborstämmen ist sie nicht mehr deutlich vorhanden (6, 17, 32), wohingegen auch mehrere Jahre alte Laborstämme im allgemeinen noch Knöpfe bilden.
Während die Knöpfe schon nach 24 Stunden sichtbar sind, entwickeln sich die Speichen erst nach einigen Tagen (5, 6, 12).
Auf der Tafel 11 sind Radspeichen von S. typhi murium und S. enteritidis abgebildet. Unter dem Einfluß von Nachbarkolonien wird im Gegensatz zur Knopfbildung die Entwicklung der Radspeichen gehemmt (Abb. 50).
Die Differentialdiagnose zwischen S. java und S. paratyphi B wird endgültig mit Hilfe der d-Tartrat-Probe gestellt (29). S. java spaltet d-Tartrat, S. paratyphi B nicht.

Auf die praktisch und epidemiologisch wichtige Unterscheidung von Paratyphus B- und Java-Stämmen machen KRISTENSEN (35), KAUFFMANN (29), ROHDE (52), SCHMIDT und LENK (54) und LENK, RASCH und BULLING (37) aufmerksam. Dauerausscheider von S. paratyphi B sind wie Typhusbakterienausscheider zu behandeln, Ausscheider von S. java brauchen dagegen nicht isoliert zu werden (29).
In Tabelle 6 sind die Kennzeichen der typischen Vertreter von S. paratyphi B, S. java und S. typhi murium zusammengestellt. Diese Tabelle wurde von KAUFFMANN (29) angegeben und durch das seltene Merkmal der Radspeichenbildung und das hier beschriebene Phänomen der Knopfbildung ergänzt.

Tabelle 6

Unterschiede zwischen S. paratyphi B, S. java und S. typhi murium (Erweiterung einer Tabelle von KAUFFMANN (29))

	S. paratyphi B	S. java	S. typhi murium
(1), 4, (5), 12	b:1,2	b:(1,2)	i:1,2
d-Tartrat	-	+	+
Schleimwall	+	-	-
Radspeichenbildung x)	-	(+)	(+)
Knopfbildung xx)	-	+	+
Mäusefütterung	Mäuse leben		M. sterben
Klinik	Paratyphus	Enteritis	

x) nach ELKELES (12), GRAETZ (17), KNORR (32) MIESSNER (40) und BRANDIS (5).

xx) ENDO-Agar, 24 h bei 37° C.

(+) = nur selten positiv.

KAUFFMANN (29) weist aber auch darauf hin, daß bei S. java und S. typhi murium die d-Tartratspaltung verzögert sein oder sogar fehlen kann und daß bei alten S. paratyphi B-Kulturen der Schleimwall fehlen kann, wie umgekehrt JANKE (27) einen S. java-Stamm beschreibt, der einen Wall bildete. Deshalb darf hier auch noch einmal erwähnt werden, daß

nicht alle Enteritis-Salmonellastämme auf ENDO-Agar stets Knöpfe bilden.

Die Beachtung der Knopfbildung auf dem ENDO-Agar erleichtert nicht nur die Diagnostik von S. java und anderen Enteritiserregern, sie kann auch eine Hilfe für die Erkennung von Mischkulturen sein, z. B. bei der Routine-Untersuchung.

C ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Mehrheit der Enteritis-Salmonellen bildet auf ENDO-Agar nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° C Kolonien mit zentralem Knopf, auf gewöhnlichem Nähragar dagegen nicht.
2. Die Knopfbildung auf ENDO-Agar ist auf dessen Gehalt an Natriumsulfit (optimale Konzentration 0,1 g%) zurückzuführen und nicht auf die anderen Beigaben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß auch Kalium- und Ammoniumsulfit diese Knopfbildung hervorrufen.
3. Die Knopfbildung wird weiter günstig beeinflußt durch
   a) eine Bebrütungstemperatur von 37° C,
   b) eine dünne ENDO-Agarschicht und
   c) den gegenseitigen Einfluß von Nachbarkolonien.
4. Keinen direkten Einfluß auf die Knopfbildung haben Änderungen des pH-Wertes, der Feuchte und der Agarkonzentration.
5. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C bildeten auf dem ENDO-Agar 81 % von 199 geprüften Salmonellastämmen der Enteritisgruppe Knöpfe, alle 36 untersuchten S. paratyphi B- und alle 70 S. typhi-Stämme dagegen nicht.
6. Bei weiterem Aufenthalt bei Zimmertemperatur erhöht sich die Zahl der knopfbildenden Enteritis-Salmonellen auf 89 %. Selten bringen dann auch Paratyphus B- und häufiger Typhusbakterienkolonien knopfartige Erhebungen hervor, die allerdings etwas breiter zu sein pflegen.

7. Auf die Bedeutung der Knopfbildung für die Differentialdiagnose besonders von S. java und S. paratyphi B und für die Erkennung von Mischkulturen wird hingewiesen.
8. Die Ergebnisse werden an Photographien von Kolonien und deren Sagittalschnitten veranschaulicht.

S C H R I F T T U M

1. BADER, R.-E.:
Die Typhus-Paratyphus-Enteritis-Gruppe (Die Salmonella-Gruppe). Erg. Hyg. 26, 235 - 332 (1949).

2. BIERKOWSKI, E.:
Die Glasfadenkapillartechnik. Zbl. Bakt. I. Orig. 161, 89 - 81 (1954).

3. BIERKOWSKI, E. und HACKENTHAL, H.:
Die Knöpfchenbildung der Paradiphtheriebakterien auf der Tellurplatte. Zbl. Bakt. I. Orig. 160, 529 - 542 (1953 - 1954).

4. BOECKER, E.:
Praktische Diagnostik der Bazillen der Typhus-Paratyphus-Enteritis-Gruppe, der Ruhrgruppe und der Coli-Gruppe. Gustav Fischer, Jena 1948, S. 9.

5. BRANDIS, H.:
Über schleimwallfreie Paratyphus-B-Stämme mit besonderer Kolonieform. Zschr. Hyg. 127, 688 - 691 (1948).

6. BRINCK, J.:
Beiträge zur Paratyphusfrage mit besonderer Berücksichtigung des Kulturbildes der einzelnen Paratyphazeen-Typen. Zbl. Bakt. I. Orig. 104, 304 - 333 (1927).

7. BURK, A.:
Mutation bei einem der Koligruppe verwandten Bakterium. Arch. Hyg. 65, 235 - 242 (1908).

8. CONRADI, H., DRIGALSKI, W. v., JÜRGENS, G.:
Ueber eine unter dem Bilde des Typhus verlaufende, durch einen besonderen Erreger bedingte Epidemie. Zschr. Hyg. 42, 141 - 174 (1903).

9. DRÄGER, H.:
Diagnostik der Bakterien der Salmonella-Gruppe und ihre Anwendung in der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Akademie-Verlag, Berlin 1951.

10. DRIGALSKI, W. v.:
Ueber eine durch Genuss von Pferdefleisch veranlaßte Massenvergiftung. Beitrag zur Aetiologie der Fleischvergiftung. Festschrift zum sechzigsten Geburtstage von Robert Koch. Gustav Fischer, Jena 1903, 409 - 444.

11. ELKELES, G.:
Zur Typentrennung und Pathogenität in der Paratyphusgruppe. Zbl. Bakt. I. Orig. 97, Beiheft, 295 - 299 (1926).

12. ELKELES, G.:
Ueber Paratyphus und Fleischvergiftung. Experimentelle Untersuchungen zum Kulturbild und zur Pathogenität mit besonderer Berücksichtigung der Kieler Lehre. Zbl. Bakt. I. Orig. 98, 326 - 354 (1926).

13. ELKELES, G. und STANDFUSS, R.:
Die Paratyphosen. In: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3. Aufl., Band 3, 2. Teil. Gustav Fischer, Jena, und Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien 1931, S. 1585 - 1826.

14. ENDO, S.:

Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen. Zbl. Bakt. I. Orig. 35, 109 - 110 (1904).

15. FISCHER, B.:

Zur Epidemiologie des Paratyphus. Festschrift zum sechzigsten Geburtstage von Robert Koch. Gustav Fischer, Jena 1903, S. 274.

16. FISCHER, B.:

Untersuchungen über den Unterleibstyphus in Schleswig-Holstein. Klin. Jahrb., Band 15, Gustav Fischer, Jena 1906, S. 80.

17. GRAETZ, F.:

Kritisches zur Paratyphus-Enteritisfrage. Zbl. Bakt. I. Orig. 97, Beiheft, 279 - 280 (1926).

18. HACKENTHAL, H. und BIERKOWSKI, E.:

Die Knöpfchenbildung auf selenhaltigen Platten als Mischinfektsymptom. Zbl. Bakt. I. Orig. 161, 156 - 164 (1954).

19. HALLMANN, L.:

Bakteriologische Nährböden. Georg Thieme, Stuttgart 1953, S. 209.

20. HARM, W.:

Genetische Betrachtungen zur Frage der Reinheit von Bakterien-Kulturen. Zbl. Bakt. 162, 153 - 159 (1955)

21. HEFTER:

Med. Naturw. Arch. 1, 81 (1909).

Zit.: BAILEY, J. L. and COLE, R. D.:

Studies on the Reaction of Sulfite with Proteins. J. of Biol. Chem. 234, 1733 - 1739 (1959).

22. HENNEBERG, G.:
Über die Feinstruktur der Bakterienkolonie. Zbl. Bakt. I. Ref. 156, 170 (1955).

23. HENNEBERG, G.:
Bild-Atlas pathogener Mikroorganismen I.
Ernst Höppner, Berlin 1957.

24. HOLLEMANN-WIBERG:
Lehrbuch der anorganischen Chemie. 37. - 39 Aufl., Walter de Gruyter & Co., Berlin 1956, S. 204.

25. HOPPE-SEYLER/THIERFELDER:
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 10. Aufl., Band 1, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953, S. 626.

26. JACOBSON, K. A.:
Mitteilungen über einen variablen Typhusstamm (Bacterium typhi mutabile) sowie über eine eigentümliche hemmende Wirkung des gewöhnlichen Agar, verursacht durch Autoklavierung. Zbl. Bakt. I. Orig. 56, 208 (1910).

27. JANKE, I.:
Zur Epidemiologie von Salmonella paratyphi B unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse in Westberlin und unter Einbeziehung einiger Lysotypieergebnisse. Inaug.-Diss. Med. Fak. der Freien Universität Berlin 1959, S. 23.

28. KAUFFMANN, F.:
Enterobacteriaceae, 2. Ed., Ejnar Munksgaard, Copenhagen 1954, S. 24.

29. KAUFFMANN, F.:
Zur Differentialdiagnose und Pathogenität von Salmonella java und Salmonella paratyphi B. Zschr. Hyg. 141, 546 - 550 (1955).

30. KAUFFMANN, F.:
Zur biochemischen und serologischen Gruppen- und Typen-Einteilung der Enterobacteriaceae. Zbl. Bakt. I. Orig. 165, 344 - 354 (1956).

31. KAUFFMANN, F.:
Das Kauffmann-White-Schema. Erg. Mikrob., Immunit.-Forsch. und exper. Ther. 30, 160 - 216 (1957).

32. KNORR, M.:
Aussprache. 11. Tagung d. Deutschen Vereinigung f. Mikrobiologie in Frankfurt a. M. 1925.
Zbl. Bakt. I. Orig. 97, Beiheft, 328 - 329 (1926).

33. KNORR, M.:
Ueber Ursachen der Schleim- und Schleimwallbildung der Paratyphusbazillen. Zbl. Bakt. I. Orig. 102, 297 - 309 (1927).

34. KOLLE, W. und HETSCH, H.:
Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten. 11. Aufl. von SCHLOSSBERGER, H., Urban und Schwarzenberg, München-Berlin 1952, S. 117.

35. KRISTENSEN, M.:
Studies on the Type Division of the Typhoid and Paratyphoid B Bacilli by Fermentation. J. Hyg. (Camb.) 38, 688 - 701 (1938).

36. LENK, V.:
Mündliche Mitteilung.

37. LENK, V., RASCH, K. und BULLING, E.:
Über das Vorkommen von S. paratyphi B (d-Tartrat negativ) bei Tieren. Zbl. Bakt. I. Orig. 180, 304 - 309 (1960).

38. LUBINSKI, H.:
Das Plattenkulturverfahren und die Gewinnung von Reinkulturen. In: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3. erweiterte Aufl., Band 10, S. 9. Gustav Fischer, Jena, und Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien 1930.

39. MASSINI, R.:
Über einen in biologischer Beziehung interessanten Kolistamm (Bacterium coli mutabile). Ein Beitrag zur Variation bei Bakterien. Arch. Hyg. 61, 250 - 292 (1907):

40. MIESSNER, H.:
Zur Differenzierung der Bakterien der Paratyphus-Enteritisgruppe. Zbl. Bakt. I. Orig. 97, Beiheft, 242 - 264 (1926).

41. MÜLLER, R.:
Ueber mutationsartige Vorgänge bei Typhus-, Paratyphus und verwandten Bakterien. Zbl. Bakt. I. Ref. 42, Beiheft, 57 - 59 (1909).

42. MÜLLER, R.:
Künstliche Erzeugung neuer vererbbarer Eigenschaften bei Bakterien. Münch. med. Wschr. 56, 885 - 886 (1909).

43. MÜLLER, R.:
Kulturunterschiede bei Paratyphus- und Enteritisbakterien. Dtsch. med. Wschr. 36, 2307 (1910).

44. MÜLLER, R.:
Mutationen bei Typhus- und Ruhrbakterien: Mutation als spezifisches Kulturmerkmal. Zbl. Bakt. I. Orig. 58, 97 - 106 (1911).

45. MÜLLER, R.:
Fleischvergiftung durch Bakterien der Paratyphus-Enteritisgruppe. Münch. med. Wschr. 59, 471 - 473 (1914).

46. MÜLLER, R.:
Medizinische Mikrobiologie, 4. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München-Berlin 1950.

47. NEISSER, M.:
Ein Fall von Mutation nach de Vries bei Bakterien und andere Demonstrationen. Zbl. Bakt. I. Ref. 38, Beiheft, 98 - 102 (1906).

48. PAPAVASSILIOU, J.:
Verwendung von Endo-Nährkartonscheiben in Kombination mit Membranfiltern mit grünem Netzaufdruck zur Wasseruntersuchung auf coliforme Bakterien. Zbl. Bakt. I. Orig. 170, 538 - 542 (1957/58).

49. POHLE, H. D.:
Zur Epidemiologie der Salmonellosen. Erhebungen über das Vorkommen von Salmonellen in Westberlin und Experimente über die biochemische Charakterisierung der Salmonellen. Berlin. Med. 9, 14 - 19 (1958).

50. PREISZ. H.:
Studien über Morphologie und Biologie des Milzbrandbazillus (mit besonderer Berücksichtigung der Sporenbildung auch bei anderen Bacillen). Zbl. Bakt. I. Orig. 35, 280 - 293 (1904).

51. RIETHMÜLLER-FAHRBACH, M.:
Mutation bei Paratyphus-B-, Shiga-Kruse-, Flexner- und Y-Ruhrbakterien durch Sorbose. Zbl. Bakt. I. Orig. 147, 438 - 446 (1941).

52. ROHDE, R.:
Über das Auftreten verschiedener Salmonellosen in Hamburg während des Jahres 1954 und die sich daraus ergebenden epidemiologischen Konsequenzen. Arch. Hyg. 139, 148 - 157 (1955).

53. ROMEIS, B.:
Mikroskopische Technik. 15. Aufl., Leibniz, München 1948.

54. SCHMIDT, B. und LENK, V.:
Über eine bei einer Enteritis-Epidemie isolierte Mischkultur von S. paratyphi B und S. java und ihre Lysotypen. Zbl. Bakt. I. Orig. 169, 366 - 372 (1957).

55. SCHMIDT, B. und LENK, V.:
Der Nachweis von Salmonellen im Abwasser als möglicher Maßstab für die Seuchenlage einer Bevölkerung. Zbl. Bakt. I. Orig. 178, 459 - 483 (1960).

56. SCHWARZ, W. und VESTER, G.:
Cremolan, ein wasserlösliches Einbettungsmittel für histologische und elektronenmikroskopische Schnittpräparate. Zschr. wiss. Mikrosk. 61, 328 - 332 (1953).

57. STOSS, B.:
Darstellung der Feinstruktur von Bakterienkolonien im Sagittalschnitt. Zbl. Bakt. I. Orig. 162, 386 - 401 (1955).

58. STOKES, J. L. and BAYNE, H. B.:
Growth rates of salmonella colonies. J. Bact. (Baltimore) 74, 200 - 206 (1957).

59. TRAUTMANN, H.:
Wie verhalten sich die klinischen Affectionen: Fleischvergiftung und Paratyphus zueinander? Zschr. Hyg. 46, 68 - 72 (1904).

60. ULBRICH, F.:
Mikrokultur der Bakterien und ihre Bedeutung für die bakteriologische Praxis, Lehre und Forschung. Zbl. Bakt. I. Orig. 162, 479 - 486 (1955).

61. WILSON, G. S. and MILES, A. A.:
Topley Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. 4. Ed., Duard Arnold, London 1955, S. 446.

62. Nachtrag zum Schrifttum:
SCHOLTENS, R. Th.:
Lysotypie von Salmonella paratyphi B mit den Phagenpräparationen von Scholtens und die von ihm angegebene "natürliche Gruppierung". Tagungsbericht. 3. Colloquium über Fragen der Lysotypie, Wernigerode (Harz), 28. September bis 2. Oktober 1957. Als Manuskript gedruckt/ Nicht im Handel. S. 33 - 39.

Tafel 2

Abb. 5 a: Salm. java (PB 1344/b). Deutliche Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 Stunden (37° C). 10 : 1.

Abb. 5 b: Sagittalschnitt durch eine Kolonie (Pfeil) der Abb. 5 a. Dreischichtung. 90 : 1.

Abb. 6 a: Salm. derby (Va 153/6). Kolonie mit Knopf. Auch auf dem Bakterienrasen erheben sich Knöpfe. 10 : 1.

Abb. 6 b: Sagittalschnitt durch die Einzelkolonie der Abb. 6 a. Dreischichtung. 90 : 1.

Abb. 7 a: Salm. typhi murium (PB 0 667). Sehr deutliche Knöpfe bei isoliert liegenden und zusammengewachsenen Kolonien. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

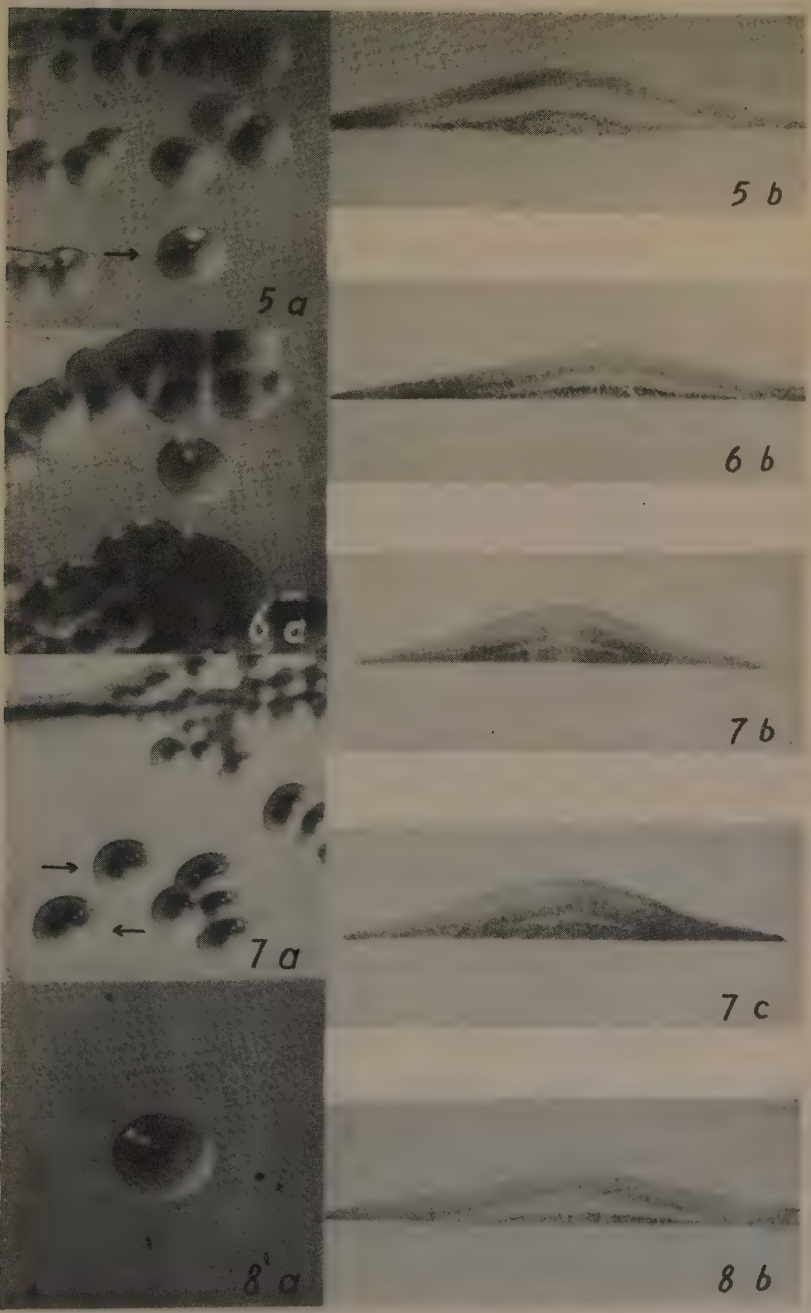
Abb. 7 b: Sagittalschnitt durch die linke obere Kolonie der Abb. 7 a. Dreischichtung. 90 : 1.

Abb. 7 c: Sagittalschnitt durch die linke untere Kolonie der Abb. 7 a.

Abb. 8 a: Salm. thompson (32/60). Deutlicher Knopf einer Einzelkolonie. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 8 b: Sagittalschnitt durch die Kolonie der Abb. 8 a. 90 : 1.

Tafel 2



Tafel 3

Abb. 9 a: Salm. potsdam (34/60). Deutlicher Knopf bei Einzelkolonie. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 9 b: Sagittalschnitt durch die Kolonie der Abb. 9 a. Nur ein Ausschnitt ist abgebildet. die Erhebung der linken Bildhälfte entspricht dem Knopf. 90 : 1.

Abb. 10 a: Salm. enteritidis (Ac 49). Knöpfe bei einzelnen und zusammenhängenden Kolonien. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 10 b: Sagittalschnitt durch die oberste Kolonie der Abb. 10 a. 90 : 1.

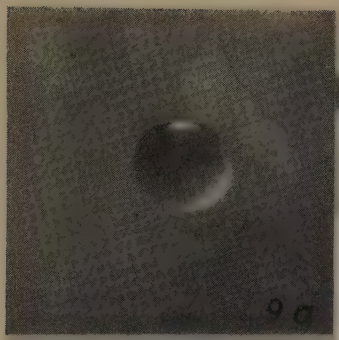
Abb. 11 a: Salm. minnesota (164/57). Knopftragende Kolonien. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 11 b: Sagittalschnitt durch eine Kolonie (Pfeil!) der Abb. 11 a. 90 : 1.

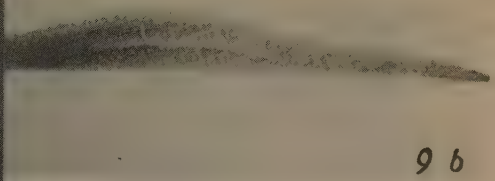
Abb. 12 a: Pseudomonas pyocyanea (XII 6 b). Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 Stunden (37° C). Eingekerbter Rand der Kolonien. 10 : 1.

Abb. 12 b: Sagittalschnitt durch eine Kolonie der Abb. 12 a. Dreischichtung angedeutet. 90 : 1.

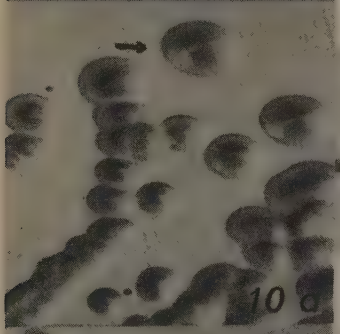
Tafel 3



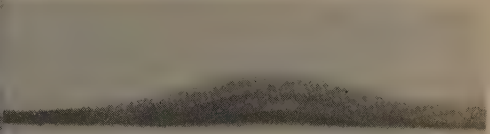
9 a



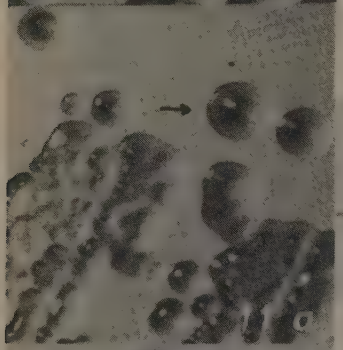
9 b



10 a

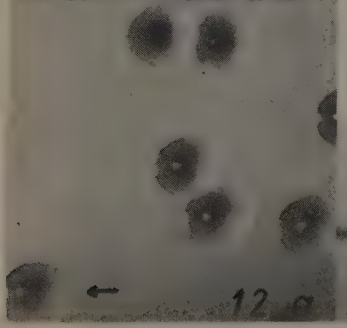


10 b



11 a

11 b



12 a

12 b

T a f e l 4

Abb. 13: Salm. a b o n y (K5/57). Knöpfe bei zusammenhängenden und einzelnen Kolonien. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 14: Salm. s a i n t - p a u l (57/1). Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 Std. bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 15: Salm. r e a d i n g (2/60). Knopf bei Einzelkolonie. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 16: Salm. b r a n d e n b u r g (76/60). Knopfbildung bei Einzelkolonie. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

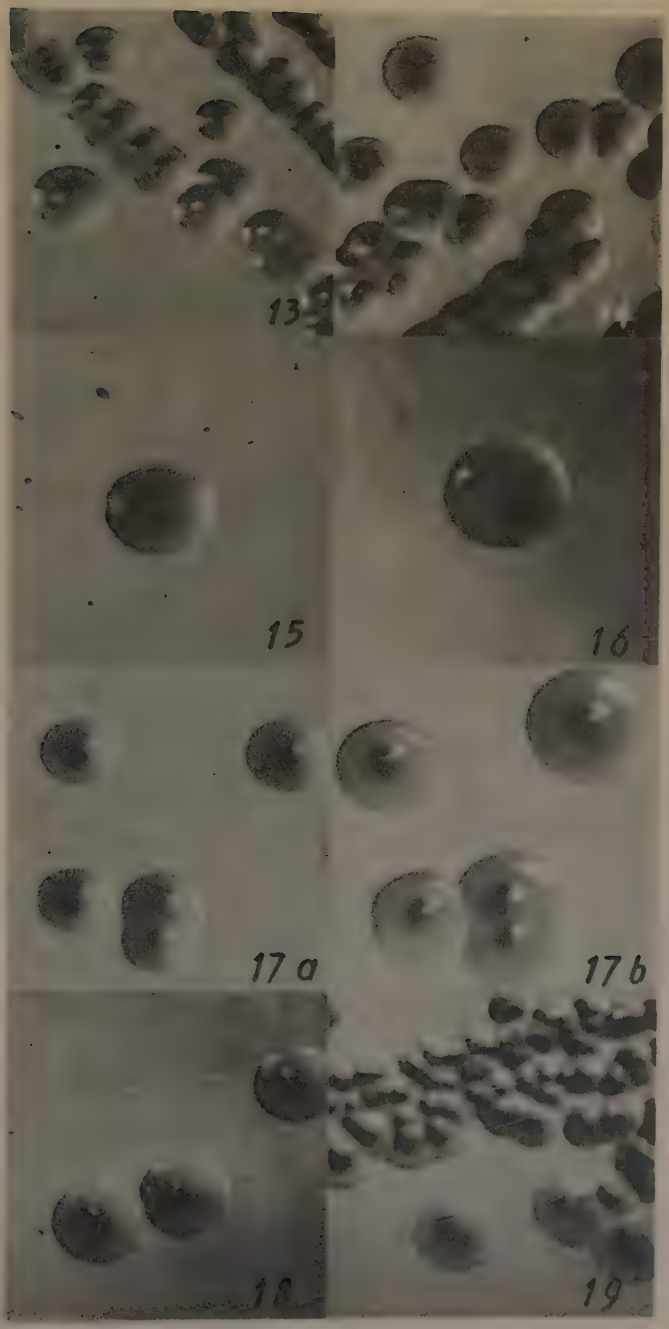
Abb. 17 a: Salm. t y p h i m u r i u m (9/60). Knopfbildung nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C. ENDO-Agar. 10 : 1.

Abb. 17 b: Die Knöpfe derselben Kolonien sind nach anschließend 24stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur wesentlich deutlicher ausgeprägt. 10 : 1.

Abb. 18: Salm. h e i d e l b e r g (87/60). Deutliche Knöpfe. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 19: Salm. b r a e n d e r u p (Ac 24). Schön ausgebildete Knöpfe im Bakterienkolonierasen und bei einer Einzelkolonie. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Tafel 4



T a f e l 5

Abb. 20: Salm. i n f a n t i s (20/57). Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 Std. (37° C). 10 : 1.

Abb. 21: Salm. b a r e i l l y (118/57). Knopfbildung auf ENDO-Agar. 24 h, 37° C. 10 : 1.

Abb. 22: Salm. n e w p o r t (C 1). Knopfbildung. ENDO-Agar, 24 h, 37° C. 10 : 1.

Abb. 23: Salm. k o t t b u s (17/60). Knopfbildung. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

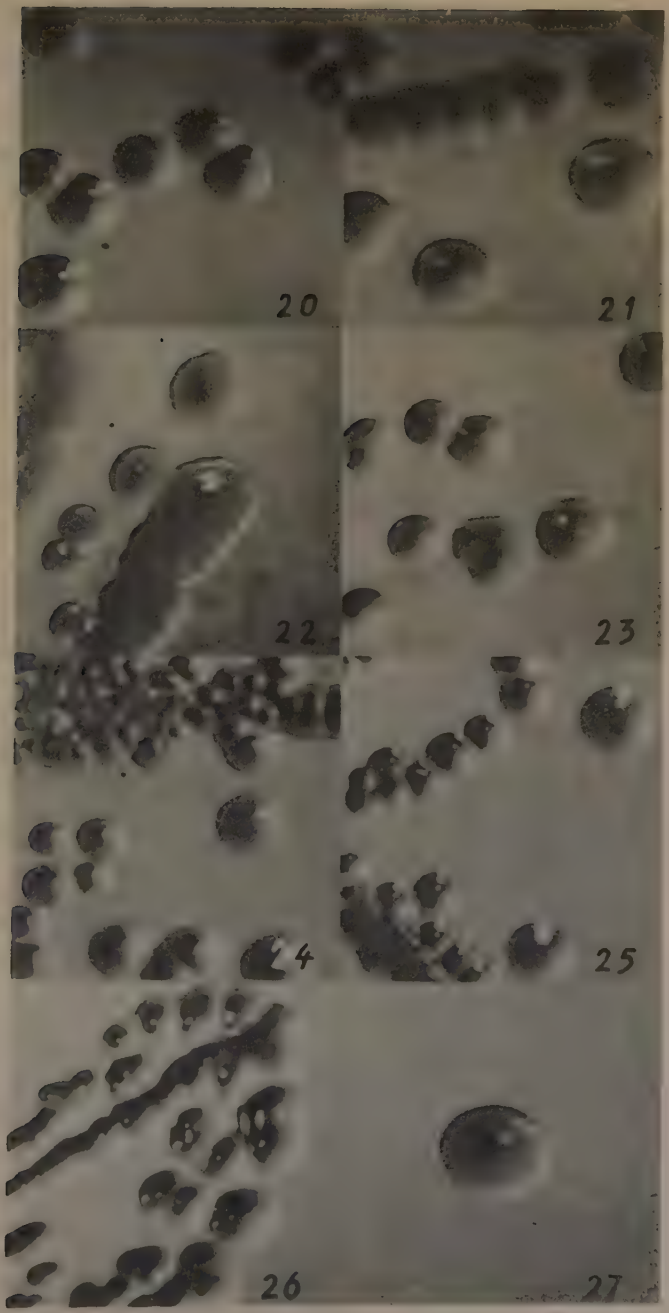
Abb. 24: Salm. m a n c h e s t e r (13/60). Knopfbildung besonders deutlich im Kolonierasen in der oberen Bildhälfte. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 25: Salm. k e n t u c k y (41/60). Knopfbildung nur bei zusammenhängenden Kolonien deutlich. Fraglicher Knopf bei der rechten Kolonie. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 26: Salm. a n a t u m (67/57). Knopfbildung bei zusammenhängenden Kolonien. ENDO-Agar, 24 Std. bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 27: Salm. g i v e (37/60). Knopfbildung bei Einzelkolonie. ENDO-Agar, 24 Std. bei 37° C. 10 : 1.

Tafel 5



T a f e l 6

Abb. 28: Salm. a m a g e r (41/57). Kolonien mit und ohne Knopf nebeneinander. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1. - Nach Überimpfen der im Bild linken knopflosen Kolonie auf eine neue ENDO-Platte entstanden wieder knopftragende und knopflose Kolonien.

Abb. 29 a: Salm. a b e r d e e n (F 3). Knopfbildung nach 24stündiger Bebrütung (37° C) auf ENDO-Agar im Bakterienkolonierasen. 10 : 1.

Abb. 29 b: Auf derselben ENDO-Platte haben isoliert stehende Kolonien von S. aberdeen in derselben Zeit noch keine Knöpfe gebildet. 10 : 1.

Abb. 29 c: Einen Tag später haben dieselben Kolonien (vgl. Abb. 29 b!) bei Zimmertemperatur Knöpfe hervorgebracht. 10 : 1.

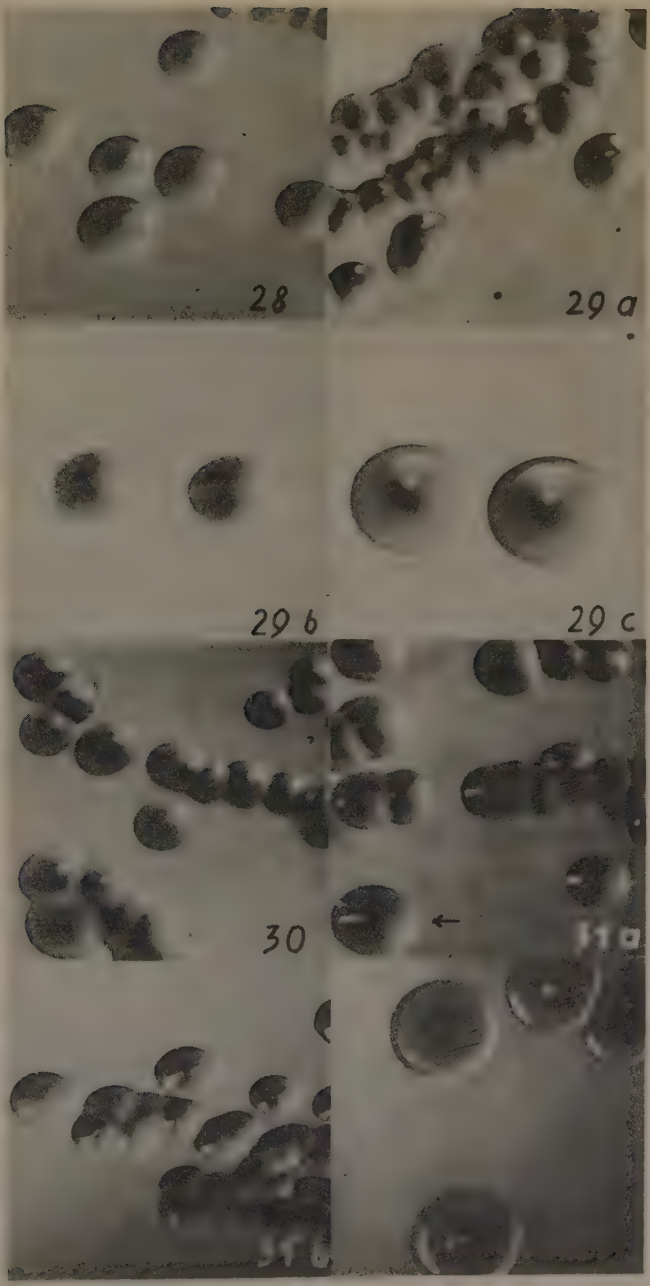
Abb. 30: Salm. w o r t h i n g t o n (73/60). Knopfbildung auf ENDO-Agar. 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 31 a: Salm. m i n n e s o t a (164/ 57). Neben Kolonien mit deutlichen Knöpfen ist eine stärker gewölbt ohne Knopf abgebildet. ENDO-Agar, 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 31 b: Nach Beimpfung einer neuen ENDO-Platte mit der knopflosen Kolonie (Pfeil!) der Abb. 31 a bildeten sich wieder Kolonien mit und ohne Knopf. 24 h bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 32: E s c h e r i c h i a c o l i (Va 211/2). Knopfbildung auf ENDO-Agar. 24 h bei 37° C. Die Knöpfe sehen dunkelrot aus. 10 : 1.

Tafel 6



T a f e l 7

Abb. 33 a: Salm. java (PB 1344/b) auf Fleischwassernähragar mit 0,1 % Natriumsulfit. Deutliche Knopfbildung. 24 Std. 37° C. 10 : 1.

Abb. 33 b: Salm. java (PB 1344/b) auf Nähragar o h n e Sulfit. Große, flache Einzelkolonie ohne Knopf. 24 Std. 37° C. 10 : 1.

Abb. 33 c: Auch dicht nebeneinander liegende Kolonien desselben Stammes auf derselben Agarplatte (vgl. Abb. 33 b!) bilden keine Knöpfe. 24 h 37° C. 10 : 1.

Abb. 34 a: Salm. enteritidis (Ac 49). Knopfbildung auf Nähragar mit 0,1 % Natriumsulfit. 24 h 37° C. 10 : 1.

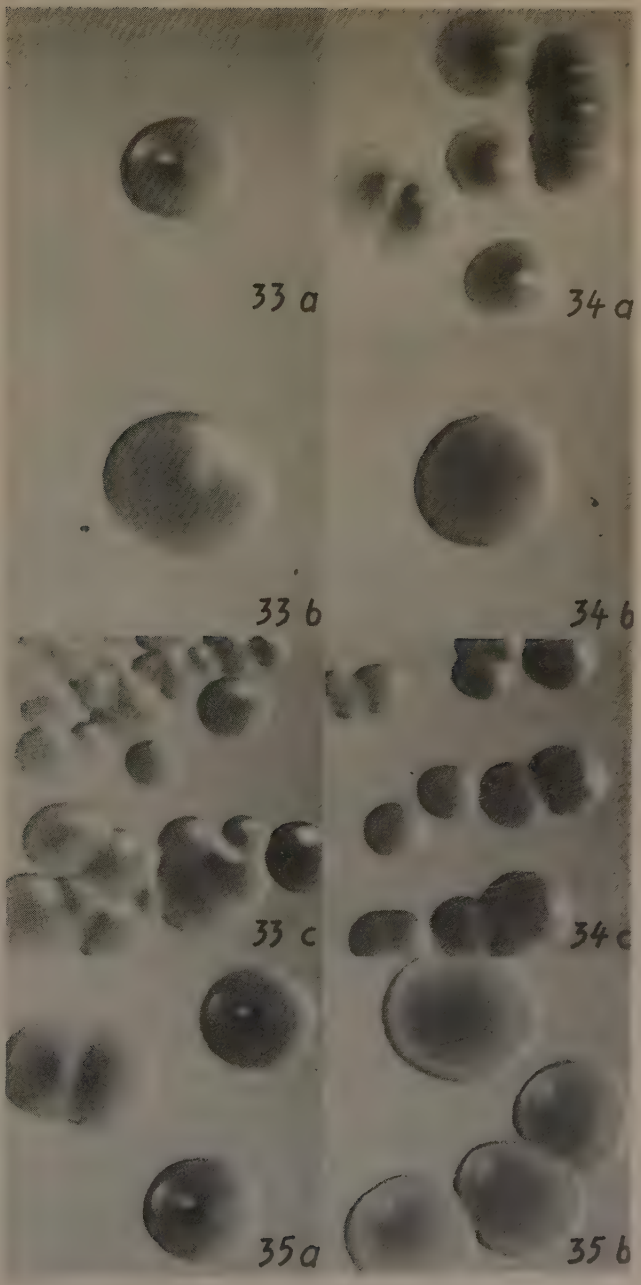
Abb. 34 b: Salm. enteritidis (Ac 49). Keine Knopfbildung bei sonst gleichen Verhältnissen (vgl. Abb. 34 a!) auf Nähragar ohne Sulfit. Einzelkolonie. 10 : 1.

Abb. 34 c: Salm. enteritidis (Ac 49). Nähragar ohne Sulfitzusatz. Keine Knopfbildung bei dicht gelagerten Kolonien. 24 h 37° C. 10 : 1.

Abb. 35 a: Salm. saint-paul (57/1). Knopfbildung auf Nähragar mit 0,1 % Natriumsulfit. 24 Std. bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 35 b: Salm. saint-paul (57/1). Keine Knopfbildung auf Nähragar ohne Sulfit. Schmaler, flacherer Randsaum. 24 Std. bei 37° C. 10 : 1.

Tafel 7



Tafel 8

Abb. 36 a: Salm. typhi murium (9/60). Deutliche Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 Std. Bebrütung bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 36 b: Salm. typhi murium (9/60). Keine Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 Std. Bebrütung bei 45° C. Der Durchmesser der Kolonien ist geringer als bei 37°. 10 : 1.

Abb. 36 c: Salm. typhi murium (9/60). Keine Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 49 Std. Bebrütung bei 22° C. Durchmesser der Kolonien ist etwa so groß wie nach 24 Std. bei 37° C. 10 : 1.

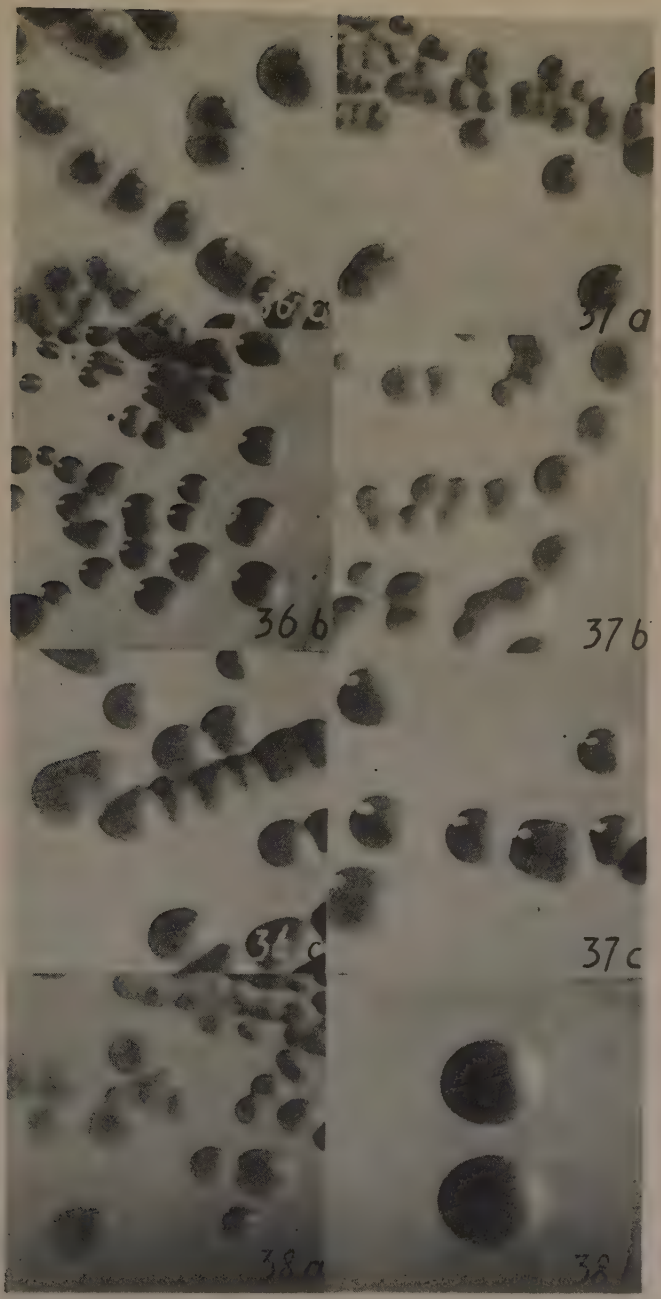
Abb. 37 a: Salm. enteritidis (Ac 49). Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 Std. bei 37° C. 10 : 1.

Abb. 37 b: Salm. enteritidis (Ac 49). Keine Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 Std. bei 45° C. 10 : 1.

Abb. 37 c: Salm. enteritidis (Ac 49). Keine Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 49 Std. bei 22° C. 10 : 1.

Abb. 38 a: Salm. java (PB 1344/b). Keine Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 24 h bei 45° C. 10 : 1.

Abb. 38 b: Salm. java (PB 1344/b). Keine Knopfbildung auf ENDO-Agar nach 49 h bei 22° C. 10 : 1.


36 a
37 a
36 b
37 b
37 c
37 c
38 a
38

Tafel 9

Abb. 39 a: S. panama (Ac 24). Deutliche Knopfbildung auf ENDO-Agar geringer Nährbodenhöhe (etwa 1,2 mm). 24 h 37° C. 10 : 1.

Abb. 39 b: Derselbe Stamm (vgl. Abb. 39 a!) unter sonst gleichen Bedingungen auf ENDO-Agar mittlerer Nährbodenhöhe (etwa 2,5 mm). Knopfbildung etwas weniger deutlich als bei Abb. 39 a. 10 : 1.

Abb. 39 c: Derselbe Stamm (vgl. Abb. 39 a und b!) bei sonst gleichen Bedingungen auf ENDO-Agar großer Nährbodenhöhe (etwa 6 mm). Keine Knopfbildung. 10 : 1.

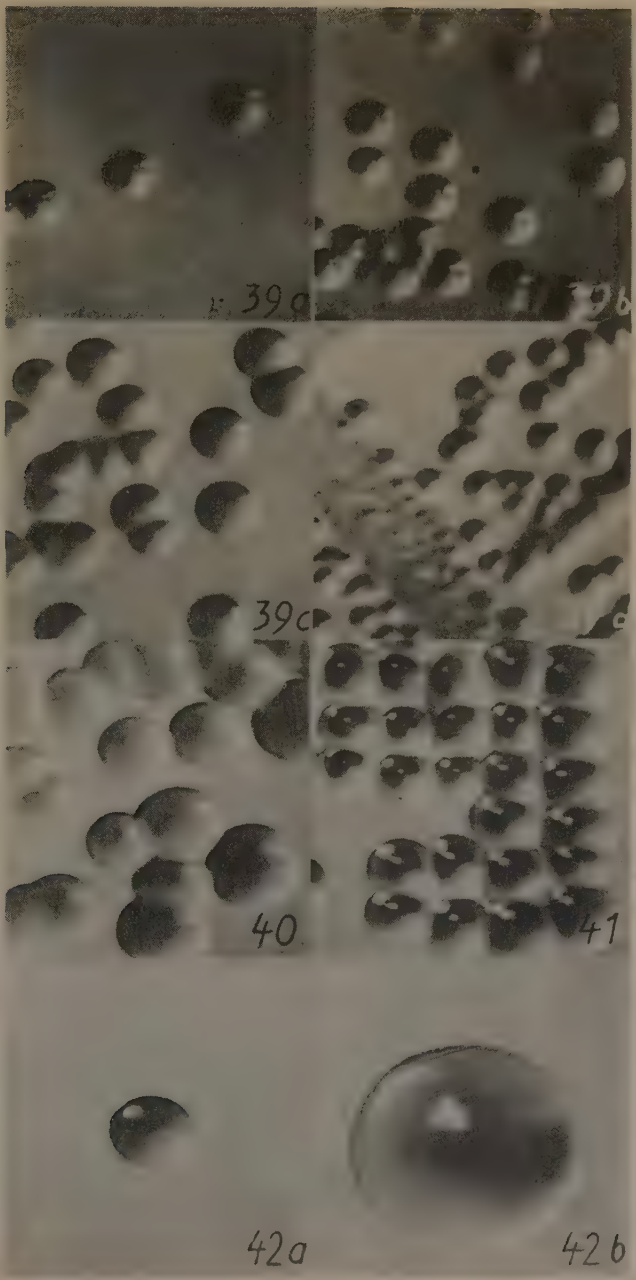
Abb. 39 d: Ganz dicht gelagerte und rings herum von Bakterienkolonierasen umgebene Kolonien auf derselben ENDO-Platte wie Abb. 39 c zeigen Knöpfe. 24 Std. 37° C. 10 : 1.

Abb. 40: S. paratyphi B (1713) auf ENDO-Agar großer Nährbodenhöhe (etwa 6 mm). Auch ganz dicht nebeneinander gelegene Kolonien haben keinen Knopf. 24 h 37° C. 10 : 1.

Abb. 41: S. enteritidis (Ac 49). Nach punktförmiger Beimpfung der ENDO-Platte im Abstand von 1 mm sind zusammenhängende Kolonien mit Knopf entstanden. 24 Std. 37° C. 10 : 1.

Abb. 42 a: Derselbe Stamm auf derselben Platte (vgl. Abb. 41!). Punktförmige Beimpfung im Abstand von 10 mm. Keine Knopfbildung. 24 h 37° C. 10 : 1.

Abb. 42 b: Dieselbe Kolonie (vgl. Abb. 42 a!), nach Bebrütung 3 Tage bei Zimmertemperatur aufgehoben, hat einen Knopf gebildet. 10 : 1.


39a
39b
39c
40
41
42a
42b

T a f e l 10

Abb. 43 a: Mischkultur von S. paratyphi B (1713) mit S. java (PB 1344/b) auf ENDO-Agar. Kleine Kolonien mit Knopf neben einer größeren und ganz flachen ohne Knopf (Mitte). 24 Std. 37° C. 10 : 1.

Abb. 43 b: Anderer Ausschnitt derselben ENDO-Platte (vgl. Abb. 43 a!). Die flachen, knopflosen Kolonien sind teilweise mit Knöpfchen tragenden zusammengewachsen. 24 Std. 37° C. 10 : 1.

Abb. 44: Schleimwallbildung nach Überimpfung der flachen Kolonie der Abb. 43 a auf Nähragar. 16 1/2 Std. 37° C und 52 Std. Zimmertemperatur. 8 : 1.

Abb. 45: Keine Schleimwallbildung nach Überimpfung der Kolonien mit Knopf der Abb. 43 a auf Nähragar. 16 1/2 Std. 37° C und 52 Std. Zimmertemperatur. 8 : 1.

Abb. 46: S. kottbus (17/60). Knopfbildung auf ENDO-Agar. Rauhe Anteile am Rande der Kolonie. 48 Std. 37° C. 10 : 1.

Abb. 47: S. saint-paul (57/1). Knopfbildung auf Nähragar mit 4 % Agar-Agar und 0,1 % Natriumsulfit. Rauhe Oberfläche und rauher Rand der Kolonie 24 Std. 37° C. 10 : 1.

Tafel 10

Abb. 48: S. typhi murium (B 31 VII/5). Radspeichenstruktur. Nähragar mit 0,1 % Natriumsulfit. 1 Tag 37° C und 7 Tage 22° C. 10 : 1.

Abb. 49: S. enteritidis (Ac 49). Radspeichenstruktur. Fältelung des Zentrums. Nähragar mit 0,1 % Indigosulfonat. 1 Tag 37° C und 4 Tage 22° C. 10 : 1.

Abb. 50: S. typhi murium (B 31 VII/5). Die Radspeichenstruktur ist in der Nähe einer anderen Kolonie (im Bild oben) schlecht ausgeprägt. Nähragar mit 0,1 % Natriumsulfit. 1 Tag 37° C und 7 Tage 22° C. Vergr. 8 : 1.

Abb. 51: Laktose nicht vergärende Escherichia coli (XXII, 10 $b_{1,0b}$). Radspeichenbildung. 24 Std. 37° C und 15 Tage Zimmertemperatur. Vergr. 8 : 1.

Abb. 52: S. paratyphi B (107/60) mit Radspeichen ähnlicher Oberflächenstruktur. (Vgl. Abb. 50!) ENDO-Agar. 24 Std. 37° C und 48 Std. Zimmertemperatur. 10 : 1.

Abb. 53: S. paratyphi B (XXII,5$b_{1,0b}$). Teilweise Ablösung des Schleimwalls von der übrigen Kolonie. ENDO-Agar. 1 Tag 37° C und ca. 8 Tage 22° C. 10 : 1.

Abb. 54: S. paratyphi B (1713). Geringe Knopfbildung. ENDO-Agar. 1 Tag 37° C und 7 Tage 22° C. 10 : 1.

Abb. 55: S. paratyphi C (Hf 3). Knopfbildung. Sulfitagar (0,1 %). 1 Tag 37° C und 7 Tage Zimmertemperatur. 10 : 1.

Tafel 11

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t für die Überlassung und liebenswürdige Unterstützung dieser Arbeit aufrichtig zu danken.
Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Volker L e n k für seine wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der Durchfuhrung dieser Untersuchungen.

L e b e n s l a u f

Am 9. Juli 1933 wurde ich in Berlin-Charlottenburg als Sohn des Polizeibeamten Rudolf Stunkat und seiner Ehefrau Lydia geb. Ufer geboren.

Von 1940 bis 1945 ging ich in Berlin, Argenbrück bei Tilsit und Wolteritz bei Delitzsch zur Volksschule und anschließend in Delitzsch, Lingen und Berlin zur Oberschule. Am 5. März 1954 bestand ich die Reifeprüfung in der Menzel-Schule in Berlin-Tiergarten.

Vom Sommersemester 1954 bis zum Wintersemester 1959/60 studierte ich Medizin an der Freien Universität Berlin.

Nach dem Staatsexamen am 23. März 1960 arbeitete ich als Medizinalassistent zehn Monate im Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin und seit dem 1. Februar 1961 im Krankenhaus der Jüdischen Gemeinde zu Berlin.